

FABIO PACHECO BRANDT

**EFEITOS DA ASSOCIAÇÃO DA NANOPARTÍCULA DE OURO
E 2-METOXI-ISOBUTIL-ISONITRILA SOBRE PARÂMETROS
DE ESTRESSE OXIDATIVO E INFLAMAÇÃO NA LESÃO DE
REPERFUSÃO MIOCÁRDICA**

Dissertação apresentada ao Programa
de Pós-Graduação em Ciências da
Saúde da Universidade do Extremo Sul
Catarinense - UNESC, para obtenção
do título de Mestre em Ciências da
Saúde.

Orientador: Prof. Dr. Ricardo Aurino de
Pinho.

CRICIÚMA
2017

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação

B821e Brandt, Fabio Pacheco.

Efeitos da associação da nanopartícula de ouro e 2-metoxi-isobutil-isonitrila sobre parâmetros de estresse oxidativo e inflamação na lesão de reperfusão miocárdica / Fabio Pacheco Bandt. - 2017.

64 p. : il.; 21 cm.

Dissertação (Mestrado) - Universidade do Extremo Sul Catarinense, Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, Criciúma, 2017.

Orientação: Ricardo Aurino de Pinho.

1. Nanopartículas de ouro – Uso terapêutico. 2. Sestamib. 3. Infarto agudo do miocárdio – Tratamento. 4. Estresse oxidativo. Lesão de reperfusão – Inflamação. I. Título.

CDD 23. ed. 615.1

Bibliotecária Eliziane de Lucca Alosilla – CRB 14/1101
Biblioteca Central Prof. Eurico Back - UNESC



UNIVERSIDADE DO EXTREMO SUL CATARINENSE – UNESC

Pró-Reitoria de Pós-Graduação, Pesquisa e Extensão

Unidade Acadêmica de Ciências da Saúde

Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde (Mestrado e Doutorado)

Recomendado pela CAPES – Homologado pelo CNE – Portaria Nº 1.919 de 03.06.2005

ATA DA 295ª DEFESA DE DISSERTAÇÃO

Ata da Defesa Pública de Dissertação do Mestrado de **Fabio Pacheco Brandt**. Aos vinte e sete dias do mês de outubro do ano de dois mil e dezesete as 14h00, na Universidade do Extremo Sul Catarinense – UNESC, reuniram-se os membros da Banca Examinadora, composta pelos senhores professores: **Dr. ALEXANDRE PASTORIS MÜLLER** (Membro Relator - UNESC), **Dra. VANESSA MORAES DE ANDRADE** (Membro Interno - UNESC) e **Dra. ALESSANDRA PERES** (Membro Externo - UFCSPA) e designados pelo Colegiado de Coordenação, a fim de argüírem a dissertação de Mestrado de **Fabio Pacheco Brandt** ao título: “EFETOS DA ASSOCIAÇÃO DA NANOPARTÍCULA DE OURO E 2-METOXI-ISOBUTIL-ISONITRILA SOBRE PARÂMETROS DE ESTRESSE OXIDATIVO E INFLAMATÓRIOS NA LESÃO DE REPERFUSÃO MIOCÁRDICA”. Aberta a sessão pelo Presidente da mesma, coube ao candidato, de forma regimental, expor o tema de sua dissertação, findo o que, dentro do tempo regulamentar, foi questionado pelos membros da Banca Examinadora e, em seguida, procedeu às explicações que se faziam necessárias. Após esse procedimento, a Banca Examinadora reuniu-se individualmente, para a avaliação final do candidato. Retornando à sessão, o Presidente, lendo o Termo de Apresentação de Dissertação, declarou, **Fabio Pacheco Brandt** APROVADO.

ALTERAÇÕES SUGERIDAS PELA BANCA EXAMINADORA:

Atender as sugestões da banca

Prof.ª **Dra. MARIA INES DA ROSA** (Presidente do Colegiado de Coordenação)

Prof. Dr. **RICARDO AURINO DE PINHO** (Orientador)

BANCA EXAMINADORA:

Prof. Dr. **ALEXANDRE PASTORIS MÜLLER** (Membro Relator - UNESC)

Prof.ª **Dra. VANESSA MORAES DE ANDRADE** (Membro Interno - UNESC)

Prof.ª **Dra. ALESSANDRA PERES** (Membro Externo - UFCSPA)

CANDIDATO: **FABIO PACHECO BRANDT**

Criciúma, SC, 27 de outubro de 2017.

FOLHA INFORMATIVA

A dissertação foi elaborada seguindo o estilo Vancouver e será apresentada no formato tradicional. Este trabalho foi realizado nas instalações do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade do Extremo Sul Catarinense, no Laboratório de Fisiologia e Bioquímica do Exercício e no Hospital de Clínicas de Porto Alegre.

AGRADECIMENTO

Agradeço, em primeiro lugar, ao Senhor dos senhores, ao Deus de Abraão, de Isaac e Jacó, o Senhor da sabedoria e do tempo.

À minha esposa Giceli Pereira de Luna Brandt, pelo amor, dedicação e paciência.

Aos meus pais, Maria Augusta Moreira Pacheco Brandt e Claudio Teixeira Brandt.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Ricardo Aurino de Pinho, o qual me deu esta grande oportunidade de aprendizado, pela paciência e disposição.

Aos professores Dr. Cláudio Teodoro de Souza, Dr. Paulo Cesar Lock Silveira, Dra. Vanessa Moraes de Andrade, aos quais tenho também como modelo de ética e saber.

Ao Prof. Dr. Marcos Marques da Silva Paula, químico brilhante, e cujo o apoio foi fundamental.

À colega e mestranda Giulia Dos Santos Pedroso, meu respeito e admiração.

A todos do Laboratório de Fisiologia e Bioquímica do Exercício (LAFIBE).

A todos os outros professores e funcionários do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde – PPGCS / UNESC.

Ao Hospital de Clínicas de Porto Alegre na pessoa do Dr. Michael Andrades e sua equipe envolvidos também no experimento.

“O temor do Senhor é o princípio da sabedoria, e o conhecimento do Santo a prudência. ”

Provérbios 9:10

RESUMO

O infarto agudo do miocárdio (IAM) é uma patologia de ocorrência frequente em todo o mundo e se caracteriza por um interrupimento do fluxo de sangue para uma região específica do coração. Se não tratada em tempo hábil, evoluirá para necrose local e afetará o entorno (peri-infarto) com posterior perda da função contrátil do músculo cardíaco. Já é sabido que uma resposta inflamatória, disfunção mitocondrial e a presença de oxidantes na região de peri-infarto comprometem a recuperação do tecido. Neste sentido, estudos que investigam novas formas de intervenções que possam reduzir os efeitos deletérios do infarto ainda são necessários. Assim, o objetivo do presente estudo foi investigar o papel de nanopartículas de ouro (NPAu) associadas ao sestamibi (MIBI) sobre a lesão por reperfusão pós isquemia e seu efeito sobre o remodelamento cardíaco em modelo experimental de IAM. Ratos Wistar (n= 48) de 3 meses de idade foram expostos ao infarto por bloqueio temporário da artéria descendente anterior por 30 minutos seguido por reperfusão com administração intraventricular cardíaca de NPAu/MIBI nas concentrações de 0,5, 1,3 e 3 µg/kg. Os animais foram acompanhados por 24 horas seguidos por eutanásia. As regiões infartadas e não infartadas do tecido cardíaco foram cirurgicamente retiradas para análise de parâmetros da função mitocondrial, inflamação e de estresse oxidativo. Em relação aos parâmetros de estresse oxidativo não houve alterações significativas na produção de DCF. Entretanto em relação ao conteúdo de GSH total, os resultados demonstraram que, embora os níveis de GSH não sofreram diferenças estatísticas em relação ao veículo MIBI, um aumento de 45% e 55% no conteúdo de GSH total foi observado nas concentrações de 1,3 µg/kg e 3 µg/kg, respectivamente, na região de infarto e a concentração de 1,3 µg/kg de NPAu reduziu significativamente os níveis de GSSG bem como aumentou a razão GSH/GSSG na área não-infartada. Em relação as citocinas anti e pró inflamatórias, os resultados demonstraram uma diminuição significativa nos níveis de TNF- α em área infartada, onde a dose de nanopartículas utilizada na reperfusão foi de 0,5µg/kg. Nos níveis de IL-6 também ocorreu uma diminuição significativa no grupo com a dose de 0,5µg/kg em relação ao grupo controle na área não infartada. Quanto aos níveis de TGF β , na área infartada houve um aumento significativo nos grupos com dose de 0,5µg/kg e 1,3µg/kg quando comparados ao grupo controle. Já na área não infartada houve uma diminuição dos níveis no grupo com dose de 0,5µg/kg quando comparado ao seu grupo controle. Tomados em conjunto os dados mostram que a

associação NPAu/MIBI, em diferentes concentrações, pode trazer benefícios no processo de lesão de reperfusão miocárdica no que diz respeito a estresse oxidativo e processo inflamatório, tanto na área infartada quanto na área não infartada.

Palavras-chave: Nanopartícula de ouro, Infarto, Isquemia-reperfusão, Inflamação, Estresse oxidativo.

ABSTRACT

Acute myocardial infarction (AMI) is a frequent occurrence worldwide and is characterized by a disruption of blood flow to a specific region of the heart. If not treated in a timely manner, it will evolve to local necrosis and will affect the environment (peri-infarction) with subsequent loss of contractile function of the heart muscle. It is already known that an inflammatory response, mitochondrial dysfunction and the presence of oxidants in the peri-infarction region compromise tissue recovery. In this sense, studies investigating new forms of interventions that may reduce the deleterious effects of infarction are still necessary. Thus, the objective of the present study was to investigate the role of gold nanoparticles (NPAu) associated with sestamibi (MIBI) on reperfusion injury after ischemia and its effect on cardiac remodeling in an experimental model of AMI. 3-month-old Wistar rats ($n = 48$) were exposed to infarction by temporary blockade of the anterior descending artery for 30 minutes followed by reperfusion with intraventricular cardiac administration of NPAu/MIBI at concentrations of 0.5, 1.3 and 3 $\mu\text{g} / \text{kg}$. The animals were followed for 24 hours followed by euthanasia. The infarcted and non-infarcted region of the cardiac tissue were surgically removed for analysis of mitochondrial function parameters, inflammation and oxidative stress. Regarding the parameters of oxidative stress, there were no significant changes in the production of DCF. However, in relation to the total GSH content, the results demonstrated that, although GSH levels did not suffer statistical differences in relation to the vehicle (MIBI), a 45% and 55% increase in total GSH content was observed at concentrations of 1.3 $\mu\text{g} / \text{kg}$ and 3 $\mu\text{g} / \text{kg}$ respectively in the infarct region and the concentration of 1.3 $\mu\text{g} / \text{kg}$ NPAu significantly reduced GSSG levels as well as increased GSH / GSSG ratio in the non-infarcted area. Regarding anti and proinflammatory cytokines, the results demonstrated a significant decrease in TNF- α levels in infarcted area, where the dose of nanoparticles used in reperfusion was 0.5 $\mu\text{g} / \text{kg}$. IL-6 levels also showed a significant decrease in the 0.5 $\mu\text{g} / \text{kg}$ dose group relative to the control group in the non-infarcted area. Regarding the levels of TGF β , in the infarcted area there was a significant increase in the groups with dose of 0.5 $\mu\text{g} / \text{kg}$ and 1.3 $\mu\text{g} / \text{kg}$ when compared to the control group. In the non-infarcted area there was a decrease in the levels in the group with a dose of 0.5 $\mu\text{g} / \text{kg}$ when compared to its control group. Taken together the data show that the association AuNP/MIBI in different concentrations can bring benefits in the process of myocardial reperfusion injury with respect

to oxidative stress and inflammatory process, both in the infarcted area and in the non-infarcted area.

Keywords: Gold nanoparticle, Infarction, Ischemia-reperfusion, Inflammation, Oxidative stress.

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

ATP – adenosina trifosfato
CONCEA - Conselho nacional de controle de experimentação animal
DAC – doença arterial coronariana
DCF - Diclorofluoresceína
DCFH-DA - Dicloro-dihidro-fluoresceína diacetato
DCV – doença cardiovascular
DLP - dislipidemia
DTNB - 5,5'-ditiobis-2-nitrobenzóico
ERO – espécies reativas de oxigênio
GR – glutationa redutase
GSH – glutationa total
GSK-3 β – glicogênio sintase quinase-3 beta
GSSG – glutationa oxidase
HAS - hipertensão arterial sistêmica
IAM – infarto agudo do miocárdio
IC – insuficiência cardíaca
IL-1 β – interleucina – 1 beta
IR – isquemia e reperfusão
LR – lesão por reperfusão
MIBI - 2-metoxi-isobutil-isonitrila
NADPH - nicotinamida adenina dinucleótido fosfato
NFkB - fator nuclear kappa B
NO – óxido nítrico
NP Au – nanopartículas de ouro
SPR - superfície de plasmon ressonante
TEM - microscopia de transmissão de elétrons
TGF- β - fator de transformação do crescimento beta 1
TNF- α – fator de necrose tumoral alfa
VDF - volume diastólico final
VSF - volume sistólico final
XO – xantina oxidase

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	23
1.1 LESÃO DE REPERFUSÃO	24
1.2 ISQUEMIA MIOCÁRDICA E INFLAMAÇÃO	25
1.3 ISQUEMIA MIOCÁRDICA E DISFUNÇÃO MITOCONDRIAL.....	27
1.4 ISQUEMIA MIOCÁRDICA E ESTRESSE OXIDATIVO	28
1.5 NANOPARTÍCULAS DE OURO	30
1.6 2-METOXI-ISOBUTIL-ISONITRILA (MIBI)	31
2 OBJETIVOS	33
2.1 OBJETIVO GERAL	33
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	33
3 MATERIAL E MÉTODOS	34
3.1 AMOSTRAS	34
3.2 DESENHO EXPERIMENTAL	34
3.3 PROTOCOLO DE ISQUEMIA-REPERFUSÃO	34
3.4 SÍNTESE E CARACTERIZAÇÃO DE NANOPARTÍCULAS DE OURO	35
3.5 SÍNTESE E ADMINISTRAÇÃO DE NPAU/SESTAMIBI	37
3.6 EUTANÁSIA E COLETA DE TECIDOS	37
3.7 ENSAIOS BIOQUÍMICOS	38
3.8 TRATAMENTO ESTATÍSTICO	38
4 RESULTADOS	39
4.1 EFEITOS DAS NANOPARTICULAS DE OURO LIGADAS AO SESTAMIBI SOBRE PARÂMETROS BIOQUÍMICOS DE ESTRESSE OXIDATIVO	39
4.2 EFEITOS DAS NANOPARTICULAS DE OURO LIGADAS AO SESTAMIBI SOBRE PARÂMETROS BIOQUÍMICOS INFLAMATÓRIOS	41
5 DISCUSSÃO	43
6 CONCLUSÃO	50
7 REFERÊNCIAS	51

1 INTRODUÇÃO

A doença arterial coronariana (DAC) é a principal causa de mortalidade e incapacidade em países desenvolvidos sendo responsável por cerca de um terço ou mais de todas as mortes em indivíduos a partir dos 35 anos (Lyond- Jones et al., 2010). Estima-se que 17,3 milhões de mortes no mundo em 2013 foram relacionadas às doenças cardiovasculares (DCV), um aumento de 41% desde 1990. Embora os números absolutos de mortes por DCV tenham aumentado significativamente desde 1990, a taxa de mortalidade padronizada por idade aumentou principalmente em indivíduos mais jovens e mulheres (Naghavi et al., 2013). Em 2001 foi relatado que a mortalidade por DCV poderá ter um aumento de aproximadamente 29% em mulheres e de 48% nos homens em países desenvolvidos até 2020 (Yusuf et al., 2001). No Brasil, no ano de 2009 as DCV foram responsáveis por 29% de todos os óbitos, representando a principal causa de morte no nosso país (Ministério da Saúde, 2011).

De acordo com Piegas et al. (2015), a DCV pode ser iniciada com a placa de aterosclerose, provocada por vários fatores de riscos, como por exemplo: hipertensão arterial sistêmica (HAS), tabagismo, dislipidemia (DLP), sedentarismo, obesidade, história familiar positiva, entre outros. Esta placa com o passar do tempo pode aumentar sua espessura até atingir todo o lúmen da artéria, ou ainda nesse processo de depósito da placa, poderá ocorrer um rompimento de sua capa fibrosa podendo desencadear um processo inflamatório com formação de trombo intracoronariano, ocluindo a luz do vaso provocando o infarto agudo do miocárdio (IAM). Nesse cenário, o IAM é a forma mais prevalente das DCV, o qual isoladamente é a segunda causa mundial de morte mais frequente, equivalendo a 7%. No sistema público de saúde do Brasil a mortalidade hospitalar dos pacientes internados por IAM é elevada, com média de 15,3%, em 2010, para as internações registradas em todo país (Piegas et al., 2015).

Estudos epidemiológicos revelam taxas de mortalidade pelo IAM em torno de 30%, sendo que metade dos óbitos ocorre nas primeiras duas horas do evento e 14% morrem antes de receber atendimento médico. Além da alta mortalidade do evento do IAM por si só, as consequências do dano provocado no músculo cardíaco acometido são graves e a maioria irreversíveis. Em decorrência do IAM, uma insuficiência cardíaca (IC) se estabelece resultante da diminuição do débito cardíaco e consequente incapacidade de manter a demanda metabólica de todos os tecidos,

contribuindo para um prejuízo da homeostase com graves danos ao paciente (Ho et al., 1993).

A ocorrência do dano no miocárdio pelo IAM decorre de uma isquemia prolongada, a qual provoca a morte de cardiomiócitos. Tem início no subendocárdio se estendendo transmuralmente em direção ao pericárdio (Metha e Cowie, 2006), levando a uma disfunção contrátil do ventrículo esquerdo. Entretanto, diversos fatores podem determinar a extensão da área de disfunção miocárdica além do tempo de comprometimento do fluxo coronariano para a irrigação do músculo envolvido. Entre esses fatores estão o aumento de mediadores inflamatórios, disfunção mitocondrial e estresse oxidativo (McDonagh et al., 1997) que quanto maior ocorrência, maior será a presença desses fatores, prejudicando ainda mais o funcionamento global do músculo cardíaco ventricular.

O fato do IAM ser decorrente da obstrução do fluxo coronário devido à formação de trombo após o rompimento de uma placa aterosclerótica, o tratamento padrão é o restabelecimento do fluxo por medidas farmacológicas ou mecânicas. A desobstrução do trombo pode ser química pelo uso de agente fibrinolítico, ou mecânico pelo processo de angioplastia coronariana. Cada modalidade de tratamento tem suas indicações e contraindicações específicas, porém ambas buscam a reperfusão do fluxo coronário (O'Gara et al., 2013). A reperfusão tem potencial para salvar o miocárdio isquêmico, mas paradoxalmente pode causar comprometimento adicional, um fenômeno chamado como "lesão de reperfusão" (LR) (Braunwald e Kloner, 1985; Piper et al., 1998). Neste sentido se faz necessário o estudo de novos agentes com propriedades de diminuir os danos provocados pela reperfusão miocárdica com consequente diminuição do tamanho de área infartada e de complicações clínicas imediatas e futuras.

1.1 LESÃO DE REPERFUSÃO

A isquemia reflete a interrupção ou comprometimento do fluxo sanguíneo e a reperfusão representa o retorno do fluxo sanguíneo a um órgão ou tecido após o processo de isquemia (Braunwald et al., 1985). A lesão de reperfusão (LR) é um termo usado para descrever as alterações, funcionais e estruturais, que se tornam aparentes durante o restabelecimento do fluxo após um período de isquemia (Piper et al., 1998). Os fenômenos de isquemia e com posterior reperfusão podem caracterizar uma LR miocárdica devido ao fato de que inicialmente a

interrupção da passagem de sangue pela coronária, o qual levaria oxigênio e nutrientes para o miocárdio, muda o metabolismo celular para anaeróbico devido à falta de oxigênio, com consequente acúmulo de lactato, depleção de ATP, sobrecarga de Na^+ e Ca^{2+} e inibição da função contrátil do miocárdio (Braunwald e Kloner, 1985; Piper et al., 1998).

A reperfusão recompõe o fluxo coronário com a passagem de sangue irrigando e oxigenando o músculo infartado, o que resulta na produção de espécies reativas de oxigênio (ERO) por diversos mecanismos tais como extravasamento de elétrons na cadeia respiratória mitocondrial e ativação da xantina oxidase. Adicionalmente, esse processo induz a abertura de poros de transição de permeabilidade mitocondrial, contribuindo para a sobrecarga de Ca^{2+} intracelular (Yellon et al., 2007; Hausenloy et al., 2013). Todos estes processos podem induzir a morte de cardiomiócitos independentemente do miocárdio isquêmico, ou seja, ocorre lesão em áreas adjacentes ao músculo infartado, lesão peri-infarto. (Hashmi e Al-Salam, 2015).

A lesão de reperfusão acomete uma porção maior do ventrículo esquerdo do que o IAM sozinho e a LR pode atuar como um determinante independente da remodelação cardíaca para além da dimensão da área infartada (Hearse et al., 1973). Hashmi e Al-Salam (2015) concluíram em trabalho experimental com ratos infartados que o dano do miocárdio no IAM é causado principalmente pela necrose isquêmica juntamente com a inflamação, enquanto que a apoptose é o principal mecanismo de morte celular em LR em adição à necrose isquêmica limitada, e mostra que os dois processos de lesão de cardiomiócitos são realmente muito distintos e o microambiente local do miocárdio determina as funções específicas de moléculas e enzimas que são parte da sua patogênese. Outro estudo também mostrou que os mecanismos subjacentes à fisiopatologia da LR do miocárdio estão relacionados com vários fatores, tais como a elevada produção de radicais livres, as alterações de cálcio intracelular, aumento da inflamação, necrose do miocárdio e a apoptose (Hearse et al., 1973).

1.2 ISQUEMIA MIOCÁRDICA E INFLAMAÇÃO

A secreção de mediadores inflamatórios no processo isquêmico pode atuar na recuperação do IAM e da isquemia miocárdica, mas em níveis elevados esses mediadores promovem um quadro de inflamação excessiva ou prolongada, piorando o desempenho cardíaco através da promoção de fibrose intersticial, tanto na área infartada e quanto na área não-infartada (lesão peri-infarto) (Bodi et al., 2008).

A resposta inflamatória induzida por IAM é fundamental para restaurar a homeostase do tecido lesionado e para ativar os mecanismos de recuperação. Interleucinas são reguladores importantes deste processo e, em conjunto com outras citocinas, contribuem para a sobrevivência e a contratilidade de cardiomiócitos por influenciar o recrutamento e a incorporação de células inflamatórias. No entanto, a inflamação sustentada também promove a fibrose intersticial e a deposição de colágeno, tanto na área do infarto e regiões que não sofreram infarto do miocárdio, que é denominada região peri-infarto, que pode levar a insuficiência cardíaca (IC) e até mesmo a ruptura cardíaca (Nian et al., 2004).

Mediadores inflamatórios participam da fisiopatologia da IC de várias maneiras, pois exercem um impacto direto sobre os cardiomiócitos, os fibroblastos e os receptores beta-adrenérgicos que levam à hipertrofia, fibrose e contratilidade cardíaca comprometida, respectivamente, ou indução de apoptose pela estimulação dos genes apropriados, contribuindo para o processo de remodelamento cardíaco contínuo (McDonagh et al., 1997; Bouras et al., 2014).

A remodelação do miocárdio que ocorre na sequência de um IAM, é um determinante crítico da função sistólica e nos volumes finais do ventrículo esquerdo, pois é caracterizada por um aumento progressivo do volume diastólico final (VDF) e do volume sistólico final (VSF), e promove também uma diminuição do volume sanguíneo ejetado por batimento cardíaco e, em consequência, leva a uma disfunção sistólica que progride para IC (McDonagh et al., 1997).

Cabrera-Fuentes e colaboradores (2016) sugerem o papel de células do sistema imunológico, após eventos isquêmicos, em que essas células são capazes de modificar a síntese de colágeno e ativar diferentes vias de sinalização em miofibroblastos, com consequências sobre a cicatrização de tecido, a formação de cicatrizes, e a função cardíaca depois de um IAM, em particular, ativação de componentes inflamatórios (TGF- β 1, IL-1 β) por neutrófilos, que propiciam a diferenciação, migração e proliferação de genes relacionados com a angiogênese. Em adição, monócitos ativam outros componentes inflamatórios (angiotensina II, NFkB), apoptose e genes relacionados com a remodelação, aumentando assim a rigidez dos fibroblastos.

Como consequência, a segmentação da matriz extracelular para evitar remodelação do VE pós IAM parece ser uma abordagem terapêutica promissora para proporcionar benefícios sinérgicos com terapias dirigidas aos cardiomiócitos (Flachskampf et al., 2011). Assim

sendo, a resposta inflamatória é um fator determinante de resultados clínicos para os pacientes que recuperam de lesão miocárdica isquêmica e abordagens terapêuticas que visam componentes da resposta inflamatória têm sido investigados como potenciais tratamentos e úteis para lesão miocárdica isquêmica (Cabrera-Fuentes et al., 2016).

1.3 ISQUEMIA MIOCÁRDICA E DISFUNÇÃO MITOCONDRIAL

As mitocôndrias são organelas intracelulares multifuncionais essenciais para uma variedade de funções celulares, incluindo a produção de energia e a termogênese (Alberts et al., 2004). A disfunção mitocondrial está no centro de uma série de doenças cardiovasculares, incluindo LR, e os tratamentos que visam preservar a função mitocondrial representam uma estratégia cardioprotetora importante para limitar o tamanho e a extensão do IAM e preservar a função cardíaca (Regitz et al., 1984). A grande maioria das publicações sobre o dano tecidual relacionado com a isquemia-reperfusão (IR) está relacionada com a teoria de que alterações do metabolismo do oxigênio na mitocôndria levam à produção excessiva de ERO, tornando-se um evento patogênico final (Ballinger et al., 2000).

Em recente revisão, Pei e colaboradores (2016) demonstraram as mitocôndrias como sendo potentes centros de apoptose em cardiomiócitos, pois estas desencadeiam papel crítico na isquemia miocárdica devido ao fato de que a isquemia reduz a quantidade de ATP miocárdico, resulta em menor produção de energia e aumento da produção de ERO. Isso faz com que a disfunção mitocondrial se torne uma evento celular importante em várias doenças cardiovasculares. Estudos sugerem que o defeito mitocondrial pode ocorrer na cadeia de transporte de elétrons complexos, desacoplamento de proteínas, no complexo translocase da membrana externa e ou no poro de transição da permeabilidade mitocondrial, o que de forma direta ou indireta contribui para a produção de ERO, com consequente disfunção mitocondrial e insuficiência miocárdica (Zorov et al., 2000; Zhang et al., 2016).

Após um evento isquêmico, a ultraestrutura e a função mitocondrial podem desempenhar um papel-chave na viabilidade celular durante a recuperação (Nohl et al., 2009). A proteção da mitocôndria cardíaca contra a isquemia miocárdica e contra a deterioração celular induzida pela reperfusão pode ser um mecanismo fundamental para a proteção cardíaca em corações isquêmicos que foram reperfundidos, ou

seja, que sofreram lesão de reperfusão (Tanno et al., 2014; Sunaga et al., 2014).

Um alvo importante de investigação no controle do metabolismo energético do miocárdio em condições de isquemia é a glicogênio-sintase-quinase-3 beta (GSK-3 β), uma quinase multifuncional constitutivamente ativa, que é importante para diversas vias de sinalização pró-sobrevivência. A interação entre a GSK-3 β e mitocôndria no contexto de LR no IAM foi sugerida por Miura et al. (2010) mostrando que a translocação mitocondrial de GSK-3 β induzida por estresse oxidativo parece ser mediada pela sua interação dependente de quinase com o canais iônicos dependentes de voltagem, e que, a fosforilação do GSK-3 β eleva a produção de ERO. Neste sentido, a inibição terapêutica deste processo pode proporcionar uma abordagem promissora para a cardioproteção, sem prejudicar as funções fisiológicas de GSK-3 β em comorbidades, tais como a diabetes, a hipertensão e insuficiência renal crônica, o que poderia contribuir, em parte, aos efeitos nocivos da LR em IAM (Tanno et al., 2014).

O impacto da idade sobre a disfunção mitocondrial, o que ocorre no contexto de LR no IAM, foi discutido por Marisol Ruiz-Meana (2014). Dados pré-clínicos sugeriram que as mitocôndrias desempenham um papel causal na susceptibilidade do miocárdio senescente à lesão isquêmica. A existência de uma alteração dependente da idade na comunicação molecular entre retículo endoplasmático e mitocôndrias parece ter consequências sobre o influxo de cálcio e produção de energética em resposta na LR. Além disso, a oxidação do ATP sintase mitocondrial prejudica a permeabilização da membrana mitocondrial e a morte celular durante os primeiros minutos de reperfusão; ainda, os mecanismos subjacentes continuam a ser caracterizado no que diz respeito à resposta a lesões cardíacas no coração envelhecido, o que representa um tema altamente relevante considerando o envelhecimento da população (Hal et al., 2014).

1.4 ISQUEMIA MIOCÁRDICA E ESTRESSE OXIDATIVO

Os radicais livres em excesso podem ser nocivos através de uma variedade de mecanismos como, por exemplo: peroxidação dos ácidos graxos das membranas celulares; oxidação de grupos sulfidril inativando uma variedade de enzimas; alterações do DNA inibindo a síntese de ATP e consumindo as reservas de dinucleotídeos de adenina e nicotinamida; alteração na modulação do óxido nítrico (NO) comprometendo os

relaxamentos vasculares dependentes do endotélio; formação de peroxinitrito; ativação de citocinas como a interleucina-1 β entre outros mecanismos envolvidos no estresse oxidativo celular (Ong et al., 2015; Yu et al., 2016).

Embora o papel das ERO e os mecanismos pelos quais essas espécies modulam o remodelamento cardíaco ou fases desse remodelamento ainda não estejam completamente elucidados, sabe-se que uma proporção significativa de ERO produzidas imediatamente após o IAM geram uma infiltração de células inflamatórias que contribui substancialmente para o estresse oxidativo. Conforme Griendling e FitzGerald (2003), várias são as fontes na produção de ERO em células cardíacas induzidas pelo IAM, como a cadeia respiratória mitocondrial, ativação de xantina oxidase e NADPH oxidase, oxidação de lipoxigenase, oxigenase-heme e do citocromo P450 mono-oxigenases .

Um dos principais sistemas de produção excessiva de ERO no IAM envolve o extravasamento de elétrons na cadeia respiratória mitocondrial dada a inúmeros fatores que controlam o fluxo de elétrons. A mitocôndria é, provavelmente, a principal fonte de geração intracelular de ERO, convertendo oxigênio em superóxido ou em derivados de peróxido de oxigênio. Até 95% dos ERO gerados no meio intracelular em situação de perfusão normal, advém da cadeia respiratória mitocondrial, o que também pode estar presente em situações de reperfusão arterial coronariana. O fluxo de prótons na matriz mitocondrial auxilia na produção de ATP e energia celular (Granger et al., 2015).

A produção excessiva de ERO é lesiva ao endotélio vascular coronariano, prejudicando o mecanismo de dilatação dos vasos e consequentemente reduzindo o fluxo sanguíneo, comprometendo também o processo de contração muscular pelos filamentos de actina e miosina, abrindo os poros de transição de permeabilidade mitocondrial, com influxo de íons cálcio e consequentes processos de apoptose e necrose celular. Estes fatores, macroscopicamente, induzem a arritmias cardíacas potencialmente fatais e ao processo de remodelamento cardíaco, com posterior insuficiência cardíaca ou morte do indivíduo (Granger et al., 2015).

A ativação da NADPH oxidase também desempenha papel crucial na regulação do crescimento e morte dos cardiomiócitos (Matsushima et al., 2014). Quando ativadas pela presença de neutrófilos, a NADPH oxidase catalisa a transferência de elétrons da NADPH para o oxigênio, resultando na produção de superóxido. As ERO produzidas a partir da quimiotaxia e ativação de neutrófilos são geradas para destruir bactérias

invasoras e remover tecidos danificados e ocorre como resultado da migração de neutrófilos vindos dos tecidos endoteliais mediada por catecolaminas, e da medula óssea mediada pelo cortisol (Ushio-Fukai, 2006). Isso faz com que sejam removidas proteínas e células danificadas e também células mortas. Embora isso seja uma reação desejável, quando não bem regulada, pode ser uma das causas de inflamações agudas devido a um grande aumento na produção de mediadores pró-inflamatórios (interleucinas 1, 6, 8 e TNF- α) e prostaglandinas, levando à indução e à intensificação de processo inflamatório adicional, aumentando a produção de ERO que são ativadores de fator transcrição NFkB (Yu et al., 2015).

Na isquemia miocárdica, o ATP é drasticamente reduzido e convertido em hipoxantina e em seguida pela atividade da xantina oxidase (XO), sob ação da reperfusão em ácido úrico. A XO catalisa a degradação do monofosfato de adenosina durante a isquemia, levando ao aumento na produção de superóxido, por ter o oxigênio proveniente da reperfusão como aceptor de elétrons. Em condições aeróbicas, o oxigênio suficiente assegura que o ATP seja repostado via fosforilação oxidativa mitocondrial e que a hipoxantina e a xantina sejam, primeiramente, convertidas para ácido úrico por meio da xantina desidrogenase, usando a nicotinamina como aceptor de elétrons (Granger et al., 1988).

1.5 NANOPARTÍCULAS DE OURO

Nos últimos anos, as nanopartículas inorgânicas vêm mostrando aplicabilidade e propriedades biológicas, químicas e físicas, consideravelmente distintas, incentivando assim diversos grupos de pesquisa a estudarem suas particularidades. (Bhattacharya et al., 2008). O tamanho destas nanopartículas varia entre 1 e 100 nanômetros (nm), sendo utilizada no diagnóstico rápido; entrega de moléculas, e de engenharia de tecidos (Durán et al., 2006).

Devido às suas dimensões, as NPs podem facilmente atravessar a membrana celular e alcançar organelas cruciais, como as mitocôndrias, o retículo endoplasmático e núcleo celular (Daniel et al., 2004). O uso de nanopartículas, mais precisamente as de ouro (NP_{Au}), acarretam inúmeros interesses para as aplicações biomédicas devido às suas propriedades de atração, a sua facilidade de síntese, caracterização e funcionalidade na superfície (Wong et al., 2013).

A utilização das nanopartículas no campo biomédico tem demonstrado interesse devido às suas características como: estabilidade

química; facilidade de síntese e processo de fabricação; biocompatibilidade genuína e por não interferir com outros biomateriais; bioconjugação de superfície com sondas moleculares, propriedades ópticas marcantes e baixa citotoxicidade (Katz et al., 2004). As aplicações das NPAu têm crescido consideravelmente devido a sua baixa citotoxicidade e alta capacidade de interação às células, com isto, são utilizadas clinicamente para melhorar o potencial das drogas, alterando a farmacocinética, biodistribuição e absorção celular (Chen et al., 2013). Os efeitos atribuídos às NPAu estão associadas à propriedades antioxidantes e anti-inflamatórias, porém o mecanismo de ação da NPAu ainda está pouco elucidado. Sabe-se que o ouro possui propriedades primordialmente antiinflamatórias, com supressão da produção mRNA para IL-1b, IL-6 e TNF- α , citocinas pró-inflamatórias, e com capacidade de redução ERO, a NPAu atua no processo de detoxificação a partir da GSH (Khan et al., 2013; Paula et al., 2015).

Diferentes estudos vêm demonstrando que a associação de NPAu com drogas ou técnicas de tratamento pode ser positiva. Em 2015, Paula e colaboradores demonstraram que a associação de NPAu a N-acetilcisteína reduz a resposta inflamatória sistêmica induzida por carragenina. No mesmo ano, Zortéa et al. (2015) mostraram que o uso da NPAu sob a ação de iontoforese e fonoforese, respectivamente, promovem uma redução dos parâmetros de estresse oxidativo mediados por processos inflamatórios induzidos por danos musculares.

1.6 2-METOXI-ISOBUTIL-ISONITRILA (MIBI)

A medicina nuclear faz uso de radiação ionizante na forma de compostos radioativos, conhecidos como radiofármacos, no intuito de estudar anomalias metabólicas e funcionais, porém além de realizar diagnósticos podem também envolver em procedimentos terapêuticos. Os radiofármacos possuem alta afinidade e biodisponibilidade para determinados sítios biológicos, o que seria potencialmente útil para o carreamento, também, de substância não radioativas com propriedades terapêuticas (Carlsson, 1995).

O radiofármaco SESTAMIBI-^{99m} Tc apresenta interesse e aplicação na rotina clínica em medicina nuclear, especialmente para avaliação da função do miocárdio (Carlsson, 1995). O SESTAMIBI-^{99m} Tc é um complexo catiônico, lipofílico, que é captado pelos miócitos na proporção do fluxo sanguíneo do miocárdio. A captação miocárdica regional de um traçador difusível é dependente do fluxo regional e da

extração do miocárdio. A proporção da atividade do traçador nos tecidos do miocárdio aumenta quando as taxas de fluxo sanguíneo arterial são mais altas, o que ocorre durante hiperemia reativa ou vasodilatação farmacológica, e ocorre diminuição da extração nos processos isquêmicos, isto é, com redução do fluxo sanguíneo arterial coronariano (Wackers et al., 1989).

De acordo com a diretriz da Sociedade Brasileira de Cardiologia sobre medicina nuclear, uma vez administrado por via venosa, o SESTAMIBI-^{99m}Tc é captado pelo miócito em processo de difusão passiva dependente do potencial elétrico transmembrana, concentrando-se predominantemente nas mitocôndrias (Muradian e Marques, 1992). Aproximadamente 90% do SESTAMIBI-^{99m}Tc intracelular está associada com a mitocôndria como um complexo catiônico livre (Papadopoulos et al., 1994).

Desta forma a associação de NPau com SESTAMIBI poderá proporcionar ação terapêutica importante, em nível mitocondrial, na lesão de reperfusão miocárdica, com efeitos sobre o estresse oxidativo e inflamação, reduzindo as complicações e mortes por IAM. Ressalta-se também, que não há ainda, descritos na literatura científica, modelo similar de abordagem terapêutica, tornado o presente estudo, pioneiro neste aspecto.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Investigar o papel da administração de nanopartículas de ouro (NPAu) ligadas ao sestamibi (MIBI), em diferentes concentrações, sobre os parâmetros de estresse oxidativo e inflamatórios em animais expostos à lesão por reperfusão em um modelo experimental de IAM.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Investigar os efeitos da administração de NPAu associada ao MIBI sobre a parâmetros de estresse oxidativo da região infartada em animais expostos à lesão por reperfusão em um modelo experimental de IAM.
2. Avaliar os efeitos da administração de NPAu associada ao MIBI sobre a parâmetros de estresse oxidativo da região não-infartada em animais expostos à lesão por reperfusão em um modelo experimental de IAM.
3. Verificar os efeitos da administração de NPAu associada ao MIBI sobre parâmetros inflamatórios da região infartada em animais expostos à lesão por reperfusão em um modelo experimental de IAM.
4. Avaliar os efeitos da administração de NPAu associada ao MIBI sobre parâmetros inflamatórios da região não-infartada em animais expostos à lesão por reperfusão em um modelo experimental de IAM.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 AMOSTRAS

Quarenta e oito ratos (*Rattus norvegicus albinus*) da linhagem Wistar (90 dias de idade, cerca de 300g), adquiridos pela Unidade de Experimentação Animal do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA) foram utilizados e randomicamente divididos em 4 grupos experimentais (n=12): IR + veículo; IR + 0,5 µg/kg de NPAu/MIBI; IR + 1,3 µg/kg de NPAu/MIBI; IR + 3,0 µg/kg de NPAu/MIBI. Após 24 horas do procedimento de reperfusão os animais foram eutanasiados e o tecido cardíaco (área infartada e área não-infartada) foram coletados para posteriores análises.

Todos os procedimentos foram realizados conforme a Lei nº 11.794/08 (Outubro/2008) e Resoluções Normativas 13 e 30, do CONCEA e aprovados pelo Comitê de Ética do HCPA sob protocolo 16-0536. Os animais foram mantidos na Unidade de Experimentação Animal, em um alojamento específico para a espécie, com temperatura controlada ($22 \pm 2^\circ\text{C}$), umidade relativa do ar em 40-60%, ciclo de luz de 12 h claro/12 h escuro, sistema de exaustão de ar, em caixas moradia com no mínimo 2 e no máximo 4 animais e passaram por um período de aclimação/quarentena de 15 dias antes do início dos procedimentos.

3.2 DESENHO EXPERIMENTAL



Esquema 01 – Desenho experimental. Os animais foram submetidos a uma isquemia de 30 minutos seguidos de reperfusão de 24 horas.

3.3 PROTOCOLO DE ISQUEMIA-REPERFUSÃO

O infarto agudo do miocárdio foi induzido de acordo com Xu et al. (2014). Inicialmente os animais foram anestesiados com xilasina (5 mg/Kg, i.p.) e cetamina (50 mg/Kg, i.p.), e tiveram o tórax tricotomizado, submetidos a intubação orotraqueal e ventilados mecanicamente com

frequência respiratória de 60 icm e volume corrente de 1,5 mL (Harvard ventilator, model 683). Durante a ventilação os animais foram anestesiados com isoflurano 2-3% a fim de manter o animal inconsciente ao longo da cirurgia. Uma incisão foi realizada no hemitorax esquerdo, com exposição da musculatura intercostal. Bupivacaina (1mg/Kg) foi injetada na musculatura intercostal antes da incisão no segundo espaço intercostal (*ictus cordis*), sem exteriorização do coração. A artéria coronária descendente anterior foi então ocluída aproximadamente a 2 mm da sua origem com fio mononylon 6.0. Após 30 minutos, a oclusão foi desfeita, permitindo a reperusão coronária. Após o final do procedimento, a cavidade torácica foi fechada e suturada com fio cirúrgico mononylon 5.0. Os animais considerados do grupo Sham foram expostos aos mesmos procedimentos, exceto a oclusão da artéria coronária. Antes da toracotomia, o pulmão dos animais foi expandido por fechamento da exaustão do ventilador mecânico para estabelecimento da pressão intratorácica. Após o procedimento cirúrgico todos os animais receberam analgésicos (tramadol 5 mg/Kg, i.p., 12/12 h em associação com dipirona 250 mg/kg, i.p., 12/12h ambos por 24 horas) para redução da dor pós-cirúrgica. O protocolo tem duração limitada em 24 horas e sinais de angústia respiratória incompatível com os níveis esperados foram usados para eutanásia prévia para evitar sofrimento dos animais.

3.4 SÍNTESE E CARACTERIZAÇÃO DE NANOPARTÍCULAS DE OURO

Nanopartículas de ouro foram sintetizadas conforme descrito por Turkevich e colaboradores (1951) com algumas modificações. Ácido cloroáurico (HAuCl_4) foi adquirido junto a Sigma-Aldrich (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA) e Citrato de sódio ($\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$), um agente redutor e estabilizante, foi adquirido com a Nuclear (Nuclear, Diadema, SP, Brasil). O tamanho das nanopartículas (10nm) de ouro foi controlado usando uma concentração adequada de Citrato de sódio, determinada previamente. Em resumo, 35 μL de HAuCl_4 foram diluídos para 100 mL, resultando numa solução 0.50 mM. Esta solução foi transferida para um balão de fundo redondo acoplado a um condensador. O sistema foi aquecido a 90 °C sob vigorosa agitação magnética. Então, 5 mL de solução de citrato de sódio 0,30 $\text{mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ foi adicionada rapidamente e o sistema, mantido sob refluxo e agitação magnética por 15 minutos. Finalmente, a solução foi resfriada até a temperatura

ambiente. Em tempo, todas as vidrarias utilizadas foram previamente lavadas com água régia (HCl/HNO_3 3:1) e rinsadas com água ultrapura.

As sínteses das nanopartículas de ouro e demais reações foram acompanhadas por espectroscopia de UV-VIS, via monitoramento da banda de superfície de plasmon ressonante (SPR – surface plasmon resonant), utilizando-se um espectrofotômetro de UV-VIS da LGS 53 Bel Photonics, Brasil. O tamanho e forma (geometria) das nanopartículas foram estimados por duas técnicas distintas, a saber: microscopia de transmissão de elétrons (TEM), com auxílio de um microscópio de transmissão de elétrons marca JEOL, modelo Titan 300 kV. Nestes casos, a amostra foi preparada diluindo-se a solução de NPAus até a absorção no máximo comprimento de onda apresentar valores abaixo de 0.1. Em seguida, esta solução foi mantida sob agitação ultrassônica por 10 minutos para evitar qualquer possível aglomeração de partículas e então, 5 uL foram depositados sobre um porta-amostras de cobre e mantida em dessecador por 24 h antes da análise. Em tempo, a caracterização por Microscopia de Transmissão de Elétrons foi realizada Centro de Investigación en Química Aplicada - CIQA, México. O tamanho do cristalito (de partículas) também foi avaliado por Difratomia de Raios-X, com auxílio de um Difrátmetro de Raios-X da SHIMADZU, modelo XRD-6000 empregando radiação monocromatizada de $\text{Cu-K}\alpha$ ($\lambda = 0.154056$ nm), operado a 30kV e 30 mA. A velocidade de varredura foi de $2^\circ/\text{min.}$, com leitura de 2θ variando no intervalo de 10 a 80° . Neste caso, o preparo da amostra foi efetuado da seguinte maneira: uma solução de NPAus recém preparada foi previamente concentrada por centrifugação a 14.000 rpm durante 15 minutos e a 15°C . O sobrenadante foi removido cuidadosamente e o concentrado de NPAus foi depositado uniformemente sobre um porta-amostras de vidro. O sistema foi deixado secar lentamente antes da leitura direta no difratômetro.

3.5 SÍNTESE E ADMINISTRAÇÃO DE NPAU/SESTAMIBI

O sestamibi foi fornecido pela empresa Nucleocor (Rio Verde, GO, Brasil), em frascos sob atmosfera de nitrogênio puro, contendo 1mg de sestamibi em pó liofilizado (Tetrafluoroborato de Cobre (1) Tetrakis (2-Metoxi-Isobutil-Isonitrila) [Cu(MIBI)₄] BF₄), sendo a diluição e complexação com NPAu realizadas em frascos à vácuo de acordo com as concentrações desejadas.

A abordagem aqui empregada é inovadora e, portanto, não há definição na literatura de uma dose de NPAu/MIBI a ser ministrada. Estudos prévios têm utilizado doses variadas de NPAu apresentando-se entre 1 e 2,5 mg/kg (sem o MIBI) injetadas sistemicamente e que não apresentam efeitos tóxicos. Por se tratar de administração *in situ*, optou-se em utilizar concentrações em escala bem menores para evitar riscos de toxicidades. Em relação ao MIBI, de acordo com o Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, testes de tolerância toxicológica realizado em camundongos não provocaram reação adversa no organismo dos animais numa dose equivalente a 1000 vezes superior à maior dose administrada em adultos humano de 70 kg, no período de observação de 72 horas.

Com base nesses pressupostos a NPAu foi administrada em associação ao MIBI em uma única dose intraventricular cardíaca, e considerando que aproximadamente 90% é fagocitado pelo sistema monocítico-macrofágico e do restante circulante aproximadamente 1% é concentrado no músculo cardíaco, nas concentrações arbitrárias de 0,5,1,3 e 3,0µg/kg no início da reperfusão (30 minutos após o bloqueio da artéria descendente anterior). O volume total administrado foi de 0,5 mL durante um tempo de 30 segundos (Säterborg, 1973; Papadopoulos, 1994; Tartuce et al., 2017).

3.6 EUTANÁSIA E COLETA DE TECIDOS

Todos os animais foram eutanasiados por exanguinação após anestesia profunda com isoflurano (5% em 0,5 L/min de O₂) e a porção ventricular anterior infartada e a porção ventricular sadia (não-infartada) foram cirurgicamente removidas por dissecação, aliquotadas, processadas e armazenadas a -80°C para posteriores análises. O descarte dos animais foi feito após acondicionamento em saco branco leitoso e armazenados em freezer -40°C para posterior tratamento e deposição final em aterro sanitário, conforme procedimentos estabelecidos pela Vigilância Sanitária (RDC 306/2004).

3.7 ENSAIOS BIOQUÍMICOS

Parâmetros de estresse oxidativo: A produção de hidroperóxidos foi determinada pela oxidação intracelular de 2',7'-diclorofluoresceína (DCFH-DA) por ERO de acordo com o método descrito anteriormente Lebel et al. (1992), com algumas modificações. Os níveis de GSH foi baseado a partir da reação de GSH com DTNB (Ellman's reagente) formando um aduto de glutathiona-TNB oxidado posteriormente reduzido pela GR na presença de NADPH com consequente síntese de GSH. A concentração de GSH total foi determinada usando uma curva de regressão gerada a partir de vários padrões de GSH. A GSSG foi mensurada a partir da reciclagem da GSSG com monitoramento NADPH espectrofotometricamente na presença de 2-vinilpyridina. A concentração de GSH total e GSSG foram determinadas usando uma curva de regressão gerada a partir de vários padrões de GSH (Rahman et al., 2006)

Parâmetros inflamatórios: A concentração no tecido de TNF- α , IL-6 e TGF- β foram utilizados como marcadores inflamatórios e determinados por kits comerciais de ELISA conforme recomendação do fabricante (R&D systems®, USA e ALPCO®, USA, Labtest®, Brazil).

3.8 TRATAMENTO ESTATÍSTICO

Os dados foram expressos em média e erro padrão médio e analisados estatisticamente pela análise de variância (ANOVA) one-way, seguido pelo teste post hoc Donette. O nível de significância estabelecido para o teste estatístico será de $p < 0,05$. O Graphpad Prism, versão 7.0 foi utilizado como pacote estatístico.

4 RESULTADOS

4.1 EFEITOS DAS NANOPARTICULAS DE OURO LIGADAS AO SESTAMIBI SOBRE PARÂMETROS DE ESTRESSE OXIDATIVO

A produção de DCF, um produto da oxidação de 2,7-dichlorodihydrofluorescein (DCFH) por espécies reativas de oxigênio, em especial o peróxido de hidrogênio, não foi alterada estatisticamente pela suplementação de NPAu tanto na área infartada quanto na não-infartada (Figuras 1A e 1B).

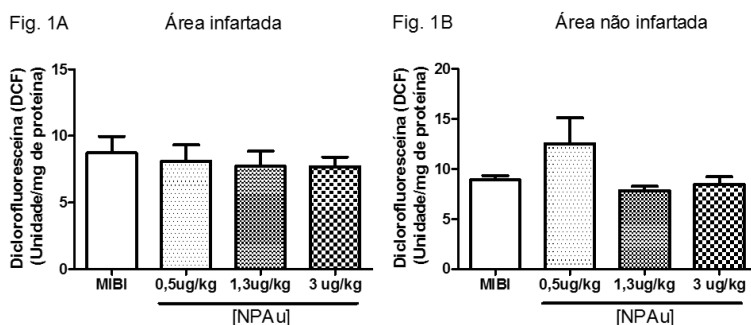


Figura 01: Efeito da administração de nanopartículas de ouro em diferentes concentrações (0,5;1,3;3 ug/kg) associadas ao MIBI durante a reperusão sobre a oxidação de DCFH após infarto agudo do miocárdio em ratos Wistar. Os valores estão apresentados em média e erro padrão da média e um $p < 0,05$ foi considerado quando detectado diferença estatística entre as diferentes concentrações e o grupo MIBI (*).

Em relação ao conteúdo de GSH total, os resultados demonstraram que, embora os níveis de GSH não sofreram diferenças estatísticas em relação ao veículo (MIBI) nas diferentes concentrações utilizadas, um aumento de 45% e 55% no conteúdo de GSH total foi observado nas concentrações de 1,3 $\mu\text{g/kg}$ e 3 $\mu\text{g/kg}$, respectivamente, na região de infarto (Figura 2A). Adicionalmente, a concentração de 1,3 $\mu\text{g/kg}$ de NPAu reduziu significativamente os níveis de GSSG (Figura 2D) bem como aumentou a razão GSH/GSSG na área não-infartada (Figura 2F).

Fig. 2A Área infartada

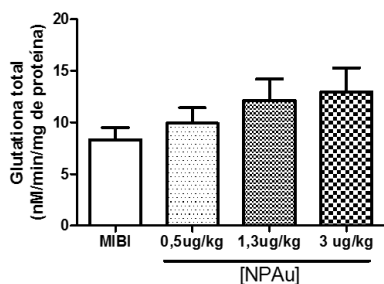


Fig. 2B Área não infartada

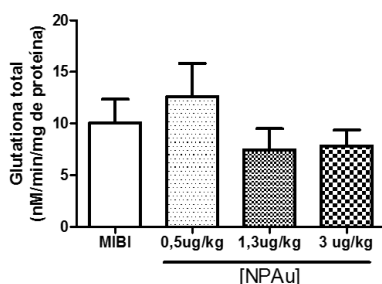


Fig. 2C Área infartada

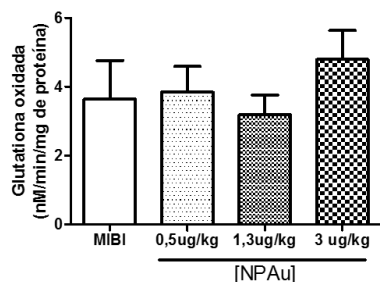


Fig. 2D Área não infartada

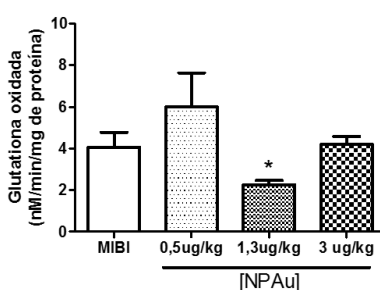


Fig. 2E Área infartada

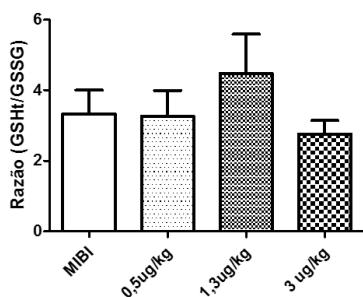


Fig. 2F Área não infartada

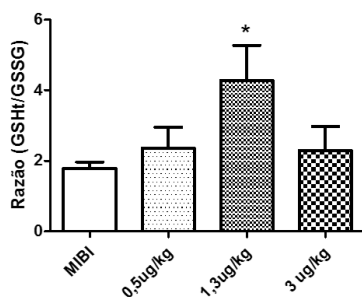


Figura 02: Efeito da administração de nanopartículas de ouro em diferentes concentrações (0,5;1,3;3 ug/kg) associadas ao MIBI durante a reperusão sobre sistema glutatona após infarto agudo do miocárdio em ratos Wistar. Os valores de GSH total (2A-B), GSSG (2C-D) e razão GSH/GSSG (2E-F) estão apresentados em média e erro padrão da média e um $p < 0,05$ foi considerado quando detectado diferença estatística entre as diferentes concentrações e o grupo MIBI (*).

4.2 EFEITOS DAS NANOPARTICULAS DE OURO LIGADAS AO SESTAMIBI SOBRE PARÂMETROS INFLAMATÓRIOS

Níveis de $\text{TNF-}\alpha$ e IL-6 foram utilizados como indicadores da resposta inflamatória induzida pela lesão por reperusão cardíaca após IAM. O $\text{TNF-}\alpha$, uma citocina que estimula a processos inflamatórios e a secreção de outras citocinas pró-inflamatórias, apresentou significativa redução na região infartada somente na concentração de 0,5 $\mu\text{g/kg}$ de NPAu, conforme observado na Figura 3A, não sofrendo significativas mudanças na área não-infartada. A IL-6, uma interleucina que atua como também citocina pró-inflamatória e está envolvida na progressão da lesão miocárdica. Os resultados observados na figura 3C e figura 3D mostram uma redução significativa nas áreas infartada e não-infartada na concentração de 0,5 $\mu\text{g/kg}$ de NPAu. As demais concentrações não apresentaram mudanças de destaque em relação ao veículo.

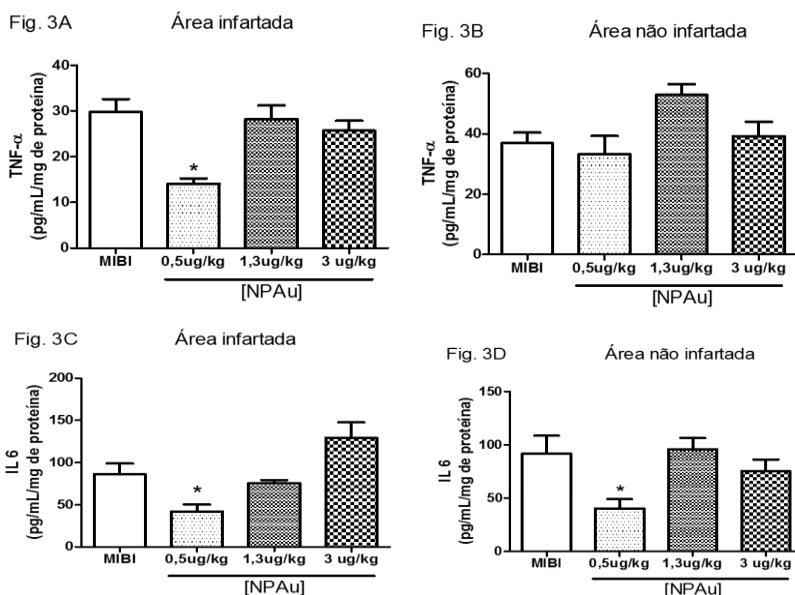


Figura 03: Efeito da administração de nanopartículas de ouro em diferentes concentrações (0,5;1,3;3 ug/kg) associadas ao MIBI durante a reperusão sobre os parâmetros inflamatórios após infarto agudo do miocárdio em ratos Wistar. Os níveis de $\text{TNF-}\alpha$ (3A-B) e IL-6 (3C-D) estão apresentados em média e erro padrão da média e um $p < 0,05$ foi considerado quando detectado diferença estatística entre as diferentes concentrações e o grupo MIBI (*).

O TGF β É uma proteína envolvida no controle da diferenciação e proliferação celular bem como na produção de colágeno tecidual. Os resultados observados na figura 4A mostra níveis elevados nas concentrações de 0,5 e 1,3 $\mu\text{g/kg}$ de NPAu na região do infarto, enquanto que na área não infartada esses níveis foram significativamente reduzidos pela NPAu apenas na concentração de 0,5 $\mu\text{g/kg}$ (Figura 4B).

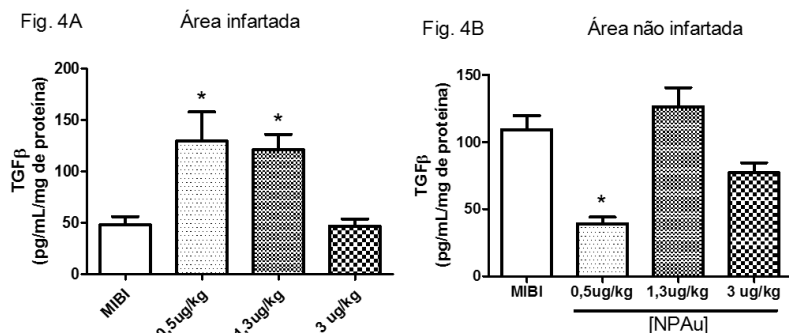


Figura 04: Efeito da administração de nanopartículas de ouro em diferentes concentrações (0,5;1,3;3 $\mu\text{g/kg}$) associadas ao MIBI durante a reperfusão sobre a síntese de colágeno após infarto agudo do miocárdio em ratos Wistar. Os níveis de TGF-beta (4A-B) estão apresentados em média e erro padrão da média e um $p < 0,05$ foi considerado quando detectado diferença estatística entre as diferentes concentrações e o grupo MIBI (*).

5 DISCUSSÃO

A finalidade principal de uma terapia no IAM é a restauração precoce do fluxo coronariano para limitar a necrose miocárdica. Para isso, a reperfusão do miocárdio, previamente isquêmico, é uma prática necessária, no entanto, tal medida pode prejudicar as células miocárdicas e endoteliais nas artérias coronárias. Embora a patogênese da lesão de reperfusão seja complexa, a formação de ERO pode desempenhar um papel crítico no quadro clínico, uma vez que estudos prévios têm demonstrado que, em modelos animais, as ERO são importantes mediadores que ampliam o quadro da lesão por reperfusão no miocárdio isquêmico (Grech, 1995; Sedláková et al., 2009).

Ainda não há tratamento efetivo para a lesão de reperfusão miocárdica. Diversos fármacos foram propostos e testados em ensaios clínicos e pré-clínicos, sem sucesso comprovado (Hausenloy et al, 2013).

Neste cenário, as abordagens terapêuticas no IAM, se baseiam primordialmente na restauração do fluxo sanguíneo arterial coronariano, por métodos mecânicos ou farmacológicos, tratando apenas do componente isquêmico, ou seja, da privação de oxigênio e nutrientes ao tecido cardíaco, deixando a lesão de reperfusão contribuir livremente para agravamento do dano ao tecido cardíaco, o que leva, em consequência, a um aumento da morbidade e mortalidade dos indivíduos em tal situação (Dominguez-Rodriguez et al., 2014).

Durante os últimos anos, houve um aumento significativo nas publicações que descrevem os modelos fisiopatológicos da lesão isquêmica e de reperfusão cardíaca em pacientes com IAM, com destaque para a lesão de reperfusão (Xu et al., 2014). Entretanto, apesar da consolidação dos conceitos fisiopatológicos, ainda há um grande desafio em buscar um tratamento efetivo para a lesão de reperfusão, haja vista, a ausência de medidas comprovadas para tal fim (Hausenloy et al, 2013).

Medicamentos à base de nanopartículas de ouro (NPAu) ligadas ou não a outras moléculas estão em alta no meio científico nos últimos anos, ou mesmo como invólucro de fármacos para a biodisponibilidade e ação terapêutica inteligente destes, também estão relatados na literatura científica (Dreaden et al, 2012). Com propriedades anti-inflamatórias (de Araújo et al., 2017) e antioxidativas (Ferreira et al., 2015; Yakimovich et al., 2008) as NPAu podem assumir conformações e dimensões variadas, permitindo assim planejar um perfil adequado de acordo com a proposta terapêutica.

De acordo com Giljohann et al. (2010) a aplicabilidade terapêutica da NPAu e respectivos efeitos está associada ao tamanho da partícula, isto é, quanto menor a partícula, maior a facilidade de difusão destas nos tecidos (Giljohann et al., 2010). Administração direta no sítio de ação, geometria e tamanhos específicos, nanoengenharia com conformações complexas, adição de outros elementos ao núcleo, revestimentos com substâncias orgânicas ou inorgânicas, biomarcadores fluorescentes ou radioativos, são estratégias descritas na literatura para aumentar a eficiência e garantir a biodisponibilidade das NPAu (Giljohann et al., 2010).

Em recente estudo deste laboratório, Tartuce e colaboradores (2017) observaram que a NPAu possui significativa interação química com o MIBI, um traçador biológico captado pelos cardiomiócitos na proporção do fluxo sanguíneo do miocárdio, e que as concentrações 0,5, 1,3 e 3,0 µg/kg de NPAu (10nm) não promovem toxicidade em diferentes tecidos corporais e não agrava a lesão por reperfusão induzida por um modelo experimental de IAM. É importante destacar que o MIBI permite a fixação prolongada das NPAu no meio intracelular, e mais especificamente intramitocondrial (Piwnicka-Worms et al, 1994), sem interferir nas propriedades farmacológicas do agente terapêutico, nesse caso a NPAu.

O MIBI é um traçador biológico utilizado de forma rotineira e segura em procedimentos diagnóstico de medicina nuclear, não possuindo efeitos tóxicos ou terapêuticos relatados. Por possuir características de biodistribuição eficiente no tecido cardíaco, principalmente nos cardiomiócitos, drogas que possuem potencial terapêutico promissor em doenças do coração, notadamente no IAM, podem ser avaliadas de forma eficaz com o sestamibi-^{99m}Tc (Longacre et al, 2011).

É neste cenário, que no presente estudo, demonstrou-se que intervenções terapêuticas com propriedades anti-inflamatórias e administradas na presença de traçadores biológicos imediatamente após o episódio isquêmico pode contribuir com a redução de mediadores oxidativos lesivos à área infartada quanto a região perinfarto.

A produção de oxidantes em músculo cardíacos de ratos infartados tem sido observada em estudos prévios (Barbosa et al., 2012, Pinho et al., 2013, Ahmed et al., 2017). No presente estudo, não se observa alterações significativas nos níveis de DCF após a intervenção com NPAu em diferentes concentrações. A principal e possível razão para essas diferenças pode estar na metodologia adotada para determinação de oxidantes. A oxidação de DCFH para DCF tem disso amplamente usado

com indicador de produção de peróxido de hidrogênio, embora estudos têm observado que DCFH também pode ser oxidado por outras espécies reativas, em menor escala, como hidroxila, peroxila, óxido nítrico e peroxidonitrito (Chen et al., 2010), o que torna o método parcialmente verdadeiro como indicador de H_2O_2 , mas é reconhecidamente um importante marcador de oxidantes celulares.

Entretanto, ao considerar o H_2O_2 sendo a principal ERO na oxidação do DCFH, é possível que este não esteja sendo produzido em níveis significativos uma vez que, em condições de IAM, níveis elevados de eNOS são observados (Ahmed et al., 2017) e esta condição favorece a formação de peroxinitrito (interação entre superóxido e NO) ao invés da dismutação do superóxido (fato a ser investigado). Dessa forma, a não alteração por NPAu não significa que a NPAu não tenha efeito antioxidante direta ou indiretamente.

Considerando o exposto acima, investigou-se o papel que a NPAu exerce sobre o sistema glutatona, uma vez que a GSH, em sua forma reduzida, tem sido considerado um dos mais importantes antioxidantes não-enzimáticos em sistemas biológicos por reagir com uma variedade de espécies reativas doando um átomo de hidrogênio e/ou servindo como substrato na atividade da glutatona peroxidase (GPx) para eliminar H_2O_2 e hidroperóxidos orgânicos (Halliwell e Gutridge, 2016).

Estudos demonstraram que em eventos de isquemia e reperfusão a depleção de GSH e consequente acúmulo de GSSG (forma oxidada) é rapidamente observada minutos de iniciar o estresse oxidativo e precede as anormalidades na função elétrica e contrátil do órgão (Ceconi et al., 2000). A mudança da forma reduzida para oxidada ocorre devido ao aumento da demanda celular de GSH, em particular, para a inativação de hidroperóxidos através da atividade da GPx, que gera GSSG como subproduto (Halliwell e Gutridge, 2016).

Observa-se que a concentração de 1,3 $\mu\text{g/kg}$ de NPAu reduziu significativamente os níveis de GSSG bem como aumentou a razão GSH/GSSG na área não-infarctada. Essa observação possui uma importância clínica relevante na prevenção de danos oxidativos na região perinfarto. Isso porque a depleção intracelular de GSH e consequente acúmulo prejudica drasticamente a função celular através de uma mudança no estado redox das proteínas reguladoras do miocárdio (Li et al., 2003). De acordo com Deneke et al., (2000) quando a GSSG se acumula nas células, ela reage de forma não enzimática com a fração proteica sulfidril (-SH) de resíduos de cisteína, causando a formação de dissulfetos (-SS) e essa modificação de resíduos de cisteína é um

mecanismo regulador importante no miocárdio pois pode comprometer vários mecanismos necessários para a sobrevivência do tecido cardíaco (Flis et al., 2012) por inativar, por exemplo, proteínas do metabolismo energético e alterações mitocondriais (Tatarková et al., 2005) ou na homeostase do cálcio, levando a uma sobrecarga intracelular de cálcio (Yan et al. 2008).

Portanto, manter os níveis basais ou aumentados de GSH protege as proteínas da oxidação ou modificação por uma reação direta de troca de tiol-dissulfeto ou agindo como um cofator para a redução mediada por peroxidases.

A presença de um ineficiente sistema antioxidante contribui para o quadro inflamatório prolongado na LR, em que pode comprometer o reestabelecimento da função contrátil, em particular, na região não afetada pelo infarto (perinfarto). Os mediadores do estresse oxidativo estão presentes em grandes quantidades nos primeiros minutos em processos de isquemia e reperfusão, sendo determinante para presença precoce e prolongada de vários mediadores intracelulares que estimulam uma resposta ineficiente de defesa, e cronicamente levam a morte celular (Kalogeris et al., 2014).

Nesse sentido, a inflamação possui papel ambíguo na lesão de reperfusão, respostas inflamatórias apropriadas em curto período estão correlacionadas a melhor evolução do IAM (Liu et al., 2016), porém, respostas inflamatórias prolongadas estão correlacionadas com maior morbidade e mortalidade, com disfunção contrátil miocárdica, remodelamento cardíaco, arritmias cardíacas graves, insuficiência cardíaca congestiva crônica e morte do indivíduo (Yellon et al., 2007). Alguns estudos experimentais correlacionaram a inibição da resposta inflamatória com redução da área infartada, porém estudos clínicos não obtiveram resultados significativos (Frangogiannis, 2014).

A resposta inflamatória de citocinas pró-inflamatórias, como o TNF- α e IL-6, são componentes integrantes da resposta à lesão tecidual e desempenham um papel importante após o IAM. Elevados níveis dessas citocinas estão correlacionados com a redução da contratilidade miocárdica e a insuficiência cardíaca tardia (Heymans et al., 2009). Porém níveis fisiológicos de TNF- α , após IAM, são importantes no reparo e remodelamento controlado das áreas isquêmicas ou infartadas (Biswas et al., 2010; Hohensinner et al., 2011).

O TNF- α , uma citocina que estimula a processos inflamatórios e a secreção de outras citocinas pró-inflamatórias, apresentou significativa redução na região infartada somente na concentração de 0,5 $\mu\text{g/kg}$ de

NPAu, conforme observado na Figura 3A, não sofrendo significativas mudanças na área não-infartada. Esse resultado sugere uma tímida ação da NPAu nas diferentes doses sobre a resposta inflamatória do miocárdio em condições de IAM mediada por TNF- α .

A redução observada na área infartada na dose de 0,5 $\mu\text{g/kg}$ é um fator a ser considerado, entretanto, a inobservância nas doses maiores e na área não-infartada pode estar relacionada às concentrações utilizadas de NPAu. Essa hipótese é suportada diante dos diversos estudos prévios que já mostram reduções significativas nos níveis de TNF- α em outros modelos experimentais (Paula et al., 2015, Zortéa, et al., 2015, Muller et al., 2017) com doses, concentrações e forma de administração diferentes daquelas utilizadas nesse estudo.

A IL-6, é uma interleucina que atua como citocina pró-inflamatória no miocárdio e está envolvida não somente na resposta inflamatória, mas também participa de mecanismos bioquímicos de regulação metabólica e regenerativa (Scheller et al., 2011). A IL-6 é produzida principalmente por linfócitos T e macrófagos, e está associada diretamente na fisiopatologia de doenças cardiovasculares, como o IAM, nas fases aguda e tardia (Boekholdt et al., 2012).

Níveis elevados dessa interleucina no IAM estimulada por três vias principais de sinalização nos cardiomiócitos: a via JAK/STAT1/3, a via Ras/ERK1/2 ou a via PI3K/AKT. A ativação dessa IL pode levar a efeitos cardioprotetivos ou piora da função contrátil cardíaca, estes resultados paradoxalmente ambíguos podem ser explicados devido à gravidade do infarto, persistência da resposta inflamatória ou mutações nos receptores de IL-6 (Hohensinner et al., 2011).

Os resultados observados nesse estudo mostram uma redução significativa dos níveis de IL-6 nas áreas infartada e não-infartada na concentração de 0,5 $\mu\text{g/kg}$ de NPAu. Essa redução observada tem um significado importante na progressão da lesão, uma vez que, a longo prazo, a resposta inflamatória por IL-6, resulta na infiltração progressiva de mais células inflamatórias no tecido cardíaco, levando à perda, também progressiva, da função contrátil e da capacidade do tecido em estabelecer um remodelamento cardíaco (Biswas et al., 2010).

Adicionalmente, o desequilíbrio entre mediadores pró-inflamatórios e anti-inflamatórios pode levar ao aumento de arritmias cardíacas potencialmente fatais e aumento da área de infarto do miocárdio (Frangogiannis et al, 2002). Uma das possíveis razões para esses resultados está no fato de estudos prévios já demonstrarem que a NPAu promove um aumento nos níveis de IL-10 (Paula et al., 2015), um citocina

anti-inflamatória. Esses mecanismo mediado pela IL-10 pode conduzir a uma redução dos níveis de IL-6 devido ao fato de que a IL-10 pode bloquear a atividade NF- κ B e também regular a via de sinalização JAK-STAT (Shuai et al., 2003).

A resposta inflamatória pode levar a um dano no tecido mais severo como também pode promover o crescimento e reparação do tecido durante o desenvolvimento ou após a lesão tecidual, como o que pode ocorrer dentro do miocárdio após o IAM.

Durante os estágios iniciais da lesão isquêmica, mediadores inflamatórios são secretados e o processo é amplificado após reperfusão coronária. Imediatamente após a restauração do fluxo sanguíneo ocorre a liberação de mastócitos cardíacos residentes e mais mediadores pró-inflamatórios são liberados iniciando um ciclo de amplificação e envolvendo células adjacentes, como células endoteliais, macrófagos residentes e, posteriormente, infiltração de neutrófilos (Epelman et al., 2015). Desta forma, frente ao exposto acima e aos resultados do presente experimento, entende-se que equilíbrio de citocinas pró-inflamatórias e anti-inflamatórias, seria necessário para a resposta terapêutica otimizada em indivíduos com IAM e lesão de reperfusão miocárdica.

Esse processo, principalmente na fase aguda, promove em consequência, a liberação de citocinas pró-fibróticas como o TGF β (Fadok et al., 1998), uma proteína que controla a proliferação, diferenciação e outras funções na maioria das células e que são capazes de desempenhar um papel central no controle da área infartada, no reparo cardíaco e na remodelação do ventrículo esquerdo (Bujak e Frangogiannis, 2007). Além disso, o TGF- β também desempenha um papel importante, como uma citocina pró-inflamatória no reparo cardíaco após infarto do miocárdio (Nah e Rhee, 2009).

O mecanismo de ação do TGF-beta, produzido por fibroblastos e células epiteliais, ocorre a partir de sua ligação com receptores quinases serina/treonina tipo I e II, tornando-se ativos, e através dos mensageiros intracelulares (Smads), que ativam genes envolvidos na proliferação e diferenciação celular, apoptose e angiogênese.

Em adição outras vias não-Smads, como PI3K, Ras, Par6, Jnk/p38/MAPK também promovem alterações celulares importantes (Chaudhury et al., 2009). No IAM, o TGF β desempenha papel primordial para o reparo do tecido cardíaco lesado. Mesmo em baixíssimas concentrações, o TGF β age diretamente como agente quimiotático de neutrófilos e monócitos, permitindo a infiltração destas células inflamatórias no tecido cardíaco, que em quantidades fisiológicas

auxiliam a regeneração celular. A TGF β induz a produção de diversas citocinas, como IL-1 β e TNF- α , proteína-1 quimioatraente de monócitos, fatores de crescimento de fibroblastos e derivados de plaquetas. Nos macrófagos e células endoteliais, o TGF β suprime a produção de citocinas pró-inflamatórias, auxiliando na homeostase tecidual (Bujak et al., 2007).

Por outro lado, concentrações elevadas de TGF β por um período prolongada, no IAM, pode exercer ação deletéria ao músculo cardíaco, agravando o processo de remodelamento, ampliação do quadro apoptótico e levar a fibrose cardíaca adjacente (Euler et al., 2015).

Os resultados mostraram níveis elevados de TGF β nas concentrações de 0,5 e 1,3 $\mu\text{g/kg}$ de NPau na região do infarto, enquanto que na área não infartada esses níveis foram significativamente reduzidos pela NPau apenas na concentração de 0,5 $\mu\text{g/kg}$ (Figura 4B).

O processo de reparo e cicatrização do tecido miocárdico é feito principalmente pela deposição de colágeno por miofibroblastos ativados, que participa também do remodelamento da matriz extracelular pela síntese e deposição de metaloproteinases (Cleutjens et al. 1995), sendo que o TGF β atua principalmente na inibição da fibrose por deposição de colágeno após a fase inflamatória inicial, o que pode ser entendido como boa resposta cardiovascular, porque na área infartada a resposta inflamatória e de remodelamento cardíaco com deposição de colágeno é mais exacerbada (Euler, 2015), necessitando desta forma maiores concentrações de TGF β para a modulação terapêutica deste processo (Bujak et al., 2007).

Lefer e colaboradores (1993) demonstraram efeito cardioprotetivo após a injeção exógena de TGF β . Em particular, na área não infartada a resposta inflamatória é significativamente menos intensa, sendo benéfico a produção de concentrações discretas e fisiológicas de citocinas pró-inflamatórias para preservação, notadamente, de áreas de penumbra isquêmica peri-infarto (Christia et al, 2013).

Esses resultados se relacionam ao fato de que a administração de NPau/MIBI na concentração de 0,5 $\mu\text{g/kg}$ de NPau levaram a uma redução da produção de citocinas pró-inflamatórias (TNF- α e IL-6), o que sugere um mecanismo regulatório induzido pela NPau com redução TGF β para manter preservada a resposta inflamatória fisiológica e necessária para recuperação do tecido.

6 CONCLUSÃO

Em termos gerais, este experimento mostrou que a administração de NPAu promove um impacto significativo nos parâmetros de estresse oxidativo e inflamatórios, em áreas infartadas e não infartadas, em diferentes concentrações, o que sugere, uma promissora aplicabilidade desta molécula para fins terapêuticos em IAM. Contudo, ressalta-se a necessidade de estudos adicionais para estender esse entendimento aos humanos e elucidar os mecanismos que permeiam tal processo não comprovadas nesse estudo. Ressalta-se ainda que apesar de alguns dos resultados não terem alcançado valores estatisticamente significativos mostraram uma tendência, ou um percentual, relevantes para modulação apropriada dos marcadores bioquímicos inflamatórios e para estresse oxidativo.

REFERÊNCIAS

- Ahmed SM, Abdelrahman SA, Salama AE. Efficacy of gold nanoparticles against isoproterenol induced acute myocardial infarction in adult male albino rats. *Ultrastructural Pathology*. 2017; 41(2), 168-185.
- Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P. *Biologia molecular da célula*. 4ª edição. Porto Alegre: Artmed; 2004.
- Alric C, Miladi I, Kryza D, Taleb J, Lux F, Bazzi R, et al. The biodistribution of gold nanoparticles designed for renal clearance. *Nanoscale*. 2013; 5(13), 5930-5939.
- Ballinger SW, Patterson C, Yan CN, Doan R, Burow DL, Young CG, et al. Hydrogen peroxide- and peroxynitrite-induced mitochondrial DNA damage and dysfunction in vascular endothelial and smooth muscle cells. *Circ Res*. 2000; 86(9): 960-6.
- Barathmanikanth S, Kalishwaralal K, Sriram M, Pandian SR, Youn HS, Eom S. Anti-oxidant effect of gold nanoparticles restrains hyperglycemic conditions in diabetic mice. *J Nanobiotechnology*. 2010; 8-16.
- Barbosa VA, Luciano TF, Vitto MF, Cesconetto PA, Marques SO, Souza DR, Pinho, RA. Exercise training plays cardioprotection through the oxidative stress reduction in obese rats submitted to myocardial infarction. *International journal of cardiology*. 2012; 157(3), 422-424.
- Bhattacharya R. Mukherjee P. Biological properties of "naked" metal nanoparticles. *Adv Drug Deliv Rev*. 2008; 60(11): 1289-306.
- Björnstedt M, Hamberg M, Kumar S, Xue J, Holmgren A. Human thioredoxin reductase directly reduces lipid hydroperoxides by NADPH and selenocystine strongly stimulates the reaction via catalytically generated selenols. *J Biol Chem*. 1995; 270(20): 11761-4.
- Biswas S, Ghoshal PK, Mandal SC, Mandal N. Relation of anti-to pro-inflammatory cytokine ratios with acute myocardial infarction. *The Korean journal of internal medicine*. 2010; 25(1), 44.

Bodi V, Sanchis J, Nunez J, Mainar L, Minana G, Benet I, et al. Uncontrolled immune response in acute myocardial infarction: unraveling the thread. *Am Heart J*. 2008; 156(6): 1065-73.

Boekholdt S, Stroes E, et al. IL6R Genetics Consortium Emerging Risk Factors Collaboration. Interleukin-6 receptor pathways in coronary heart disease: a collaborative meta-analysis of 82 studies. *The Lancet*. 2012; 379(9822), 1205-1213.

Bouras G, Giannopoulos G, Hatzis G, Alexopoulos D, Leventopoulos G, Devereux S. Inflammation and chronic heart failure: from biomarkers to novel anti-inflammatory therapeutic strategies. *Med Chem*. 2014; 10(7):682-99.

Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*. 1976; 72: 248-54.

Braunwald E, Kloner RA. Myocardial reperfusion: a double-edged sword? *J Clin Invest*. 1985; 76(5): 1713-9.

Braunwald E. The war against heart failure: the Lancet lecture. *Lancet*. 2015; 385(9970) :812-24.

Bujak M, Frangogiannis NG. The role of TGF- β signaling in myocardial infarction and cardiac remodeling. *Cardiovascular Research*. 2007; 74(2), 184-195.

Cabrera-Fuentes HA, Alba-Alba C, Aragones J, Bernhagen J, Boisvert WA, Hans E, et al. Meeting report from the 2nd International Symposium on New Frontiers in Cardiovascular Research. Protecting the cardiovascular system from ischemia: between bench and bedside. *Basic Res Cardiol*. 2016; 111: 7.

Carlsson S. A glance at the history of nuclear medicine. *Acta Oncol*. 1995;34(8):1095-102.

Ceconi C, Bernocchi P, Boraso A, Cargnoni A, Pepi P, Curello S, et al. New insights on myocardial pyridine nucleotides and thiol redox state in ischemia and reperfusion damage. *Cardiovasc Res*. 2000;47:586– 94.

Cleutjens JP, Verluyten MJ, Smiths JF, Daemen MJ. Collagen remodeling after myocardial infarction in the rat heart. *Am J Pathol.* 1995;147:325–38

Chaudhury, A., & Howe, P. H. (2009). The tale of transforming growth factor-beta (TGF β) signaling: A soigné enigma. *IUBMB life*, 61(10), 929-939.

Chen X, Zhong Z, Xu Z, Chen L, Wang Y. 2', 7'-Dichlorodihydrofluorescein as a fluorescent probe for reactive oxygen species measurement: forty years of application and controversy. *Free radical research.* 2010; 44(6), 587-604.

Christia P, Bujak M, Gonzalez-Quesada C, Chen W, Dobaczewski M, Reddy A, Frangogiannis NG. Systematic characterization of myocardial inflammation, repair, and remodeling in a mouse model of reperfused myocardial infarction. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry.* 2013; 61(8), 555-570.

Daniel MC, Astruc D. Gold nanoparticles: assembly, supramolecular chemistry, quantum-size-related properties, and applications toward biology, catalysis, and nanotechnology. *Chem Rev.* 2004; 104(1): 293-346.

De Araújo RF, de Araújo AA, Pessoa JB, Neto FPF, da Silva GR, Oliveira ALCL, Gasparotto LH. Anti-inflammatory, analgesic and anti-tumor properties of gold nanoparticles. *Pharmacological Reports.* 2017; 69(1), 119-129.

Deneke SM. Thiol-based antioxidants. *Curr Top Cell Regul* 2000;36: 151–80

Dohnert MB, Venâncio M, Possato JC, Zeferino RC, Dohnert LH, Zugno AI, De Souza CT, Paula, MM, Luciano, TF. Gold nanoparticles and diclofenac diethylammonium administered by iontophoresis reduce inflammatory cytokines expression in Achilles tendinitis. *Int J Nanomedicine.* 2012; 7: 1651-1657.

Dominguez-Rodriguez A, Abreu-Gonzalez P, Reiter RJ. Cardioprotection and pharmacological therapies in acute myocardial infarction: Challenges in the current era. *World journal of cardiology*. 2014; 6.3: 100.

Dreaden EC, Alkilany AM, Huang X, Murphy CJ, El-Sayed MA. The golden age: gold nanoparticles for biomedicine. *Chemical Society Reviews*. 2012; 41(7), 2740-2779.

Durán N, Morais PC, Mattoso LHC. Nanotecnologia: introdução, preparação e caracterização de nanomateriais e exemplos de aplicação. 1ª ed. São Paulo (SP): Artliber, c2006. 208 p.

Epelman S, Liu PP, Mann DL. Role of Innate and Adaptive Immunity in Cardiac Injury and Repair. *Nature reviews Immunology*. 2015; 15(2), 117.

Esposito E, Cuzzocrea S. TNF-alpha as a therapeutic target in inflammatory diseases, ischemia-reperfusion injury and trauma. *Current medicinal chemistry*. 2009; 16(24), 3152-3167.

Euler G. Good and bad sides of TGFβ-signaling in myocardial infarction. *Frontiers in physiology*. 2015; 6.

Fadok VA, Bratton DL, Konowal A, Freed PW, Westcott JY, Henson PM. Macrophages that have ingested apoptotic cells in vitro inhibit proinflammatory cytokine production through autocrine/paracrine mechanisms involving TGF-beta, PGE2, and PAF. *Journal of Clinical Investigation*. 1998; 101(4), 890.

Ferreira GK, Cardoso E, Vuolo FS, Michels M, Zanoni ET, Carvalho-Silva M, da Silva PMM. Gold nanoparticles alter parameters of oxidative stress and energy metabolism in organs of adult rats. *Biochemistry and Cell Biology*. 2015; 93(6), 548-557.

Flachskampf FA, Schmid M, Rost C, Achenbach S, DeMaria AN, Daniel WG. Cardiac imaging after myocardial infarction. *Eur Heart J*. 2011; 32: 272–83.

Fliss H, Masika M, Eley DW, Korecky B. Oxygen radical mediated protein oxidation in heart. *Oxygen Radicals in the Pathophysiology of Heart Disease*. Kluwer Academic Publishers. Boston. 1988; 71-90.

Frangogiannis, NG. The inflammatory response in myocardial injury, repair, and remodelling. *Nature Reviews Cardiology*. 2014; 11.5: 255-265.

Frangogiannis NG, Smith CW, Entman ML. The inflammatory response in myocardial infarction. *Cardiovascular research*. 2002; 53(1), 31-47.

Frezza C, Cipolat S, Scorrano L. Measuring mitochondrial shape changes and their consequences on mitochondrial involvement during apoptosis. *Methods Mol Biol*. 2007; 372: 405-20.

Giljohann DA, Seferos DS, Daniel WL, Massich MD, Patel PC, Mirkin CA. Gold nanoparticles for biology and medicine. *Angewandte Chemie International Edition*. 2010; 49(19), 3280-3294.

Gomes A, Fernandes E, Lima JL. Fluorescence probes used for detection of reactive oxygen species. *Journal of biochemical and biophysical methods*. 2005; 65(2), 45-80.

Granger DN. Role of xanthine oxidase and granulocytes in ischemia-reperfusion injury. *Am J Physiol*. 1988; 255(6 Pt 2): H1269-75.

Granger DN; Kvietys PR. Reperfusion injury and reactive oxygen species: the evolution of a concept. *Redox Biology*. 2015; v. 6, p. 524-551.

Grech ED, Jackson MJ, Ramsdale DR. Reperfusion injury after acute myocardial Infarction, *Br. Med. J*. 1995; 77, 477- 478.

Griendling KK, FitzGerald GA. Oxidative stress and cardiovascular injury: Part I: basic mechanisms and in vivo monitoring of ROS. *Circulation*. 2003; 108(16): 1912-6.

Hall AR, Burke N, Dongworth RK, Hausenloy DJ. Mitochondrial fusion and fission proteins: novel therapeutic targets for combating cardiovascular disease. *Br J Pharmacol*. 2014; 171(8): 1890-906.

Halliwell B, Gutteridge JMC. Free radicals in biology and medicine. 4th ed. New York: University Press; 2007.

Hashmi S, Al-Salam S. Acute myocardial infarction and myocardial ischemia-reperfusion injury: a comparison. *J Clin Exp Pathol*. 2015; 8(8): 8786-96.

Hausenloy DJ, Yellon DM. Myocardial ischemia-reperfusion injury: a neglected therapeutic target. *J Clin Invest*. 2013; 123(1): 92-100.

Hausenloy DJ, et al. Translating novel strategies for cardioprotection: the Hatter Workshop Recommendations. *Basic Res Cardiol*. 2010;105(6):677–686.

Hearse DJ, Humphrey SM, Chain EB. Abrupt reoxygenation of the anoxic potassium-arrested perfused rat heart: a study of myocardial enzyme release. *J Mol Cell Cardiol*. 1973; 5(4): 395-407.

Heymans S, Hirsch E, Anker SD, Aukrust P, Balligand JL, Cohen-Tervaert JW, Hilfiker-Kleiner D. Inflammation as a therapeutic target in heart failure? A scientific statement from the Translational Research Committee of the Heart Failure Association of the European Society of Cardiology. *European journal of heart failure*. 2009; 11(2), 119-129.

Hilfiker-Kleiner D, Shukla P, Klein G, Schaefer A, Stapel B, Hoch M, et al. Continuous glycoprotein-130-mediated signal transducer and activator of transcription-3 activation promotes inflammation, left ventricular rupture, and adverse outcome in subacute myocardial infarction. *Circulation*. 2010;122:145–155.

Ho KK, Pinsky JL, Kannel WB, Levy D. The epidemiology of heart failure: the Framingham Study. *The epidemiology of heart failure: the Framingham Study*. *J Am Coll Cardiol*. 1993; 22(4 Suppl A) :6A-13A.

Hohensinner PJ, Niessner A, Huber K, Weyand CM, Wojta J. Inflammation and cardiac outcome. *Current opinion in infectious diseases*. 2011; 24(3), 259.

Hwang SJ, Jun SH, Park Y, Cha SH, Yoon M, Cho S, Lee HJ, Park Y. Green synthesis of gold nanoparticles using chlorogenic acid and their enhanced performance for inflammation. *Nanomedicine*. 2015; 11:1677-1688.

Kalogeris T, Yimin B, Korthuis RJ. Mitochondrial reactive oxygen species: a double edged sword in ischemia/reperfusion vs preconditioning. *Redox Biology*. 2014; 702-714.

Katz E, Willner I. Integrated nanoparticle-biomolecule hybrid systems: synthesis, properties, and applications. *Angew Chem Int Ed Engl*. 2004; 43(45): 6042-108.

Khan MS, Vishakante GD, Siddaramaiah H. Gold nanoparticles: a paradigm shift in biomedical applications. *Adv Colloid Interface Sci*. 2013; 199-200: 44-58.

Khlebtsov N, Dykman L. Biodistribution and toxicity of engineered gold nanoparticles: a review of in vitro and in vivo studies. *Chemical Society Reviews*. 2011; 40(3), 1647-1671.

Lebel CP, Ischiropoulos H, Bondy SC. Evaluation of the probe 2',7'-dichlorofluorescein as an indicator of reactive oxygen species formation and oxidative stress. *Chem Res Toxicol*. 1992; 5(2): 227-31.

Lefer AM, Ma XL, Weyrich AS, Scalia R. Mechanism of the cardioprotective effect of transforming growth factor beta 1 in feline myocardial ischemia and reperfusion. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1993; 90:1018-22

Lloyd-Jones D, Adams RJ, Brown TM, Carnethon M, Dai S, De Simone G, et al. Executive summary: heart disease and stroke statistics--2010 update: a report from the American Heart Association. *Circulation*. 2010; 121(7): 948-54.

Liu J, Wang H, Li J. Inflammation and inflammatory cells in myocardial infarction and reperfusion injury: a double-edged sword. *Clinical Medicine Insights Cardiology*. 2016; 10, 79.

Longacre LS, Kloner RA, Arai AE, Baines CP, Bolli R, Braunwald E, et al. New horizons in cardioprotection. *Circulation*. 2011; 124(10), 1172-1179.

Luo AK, Wu KC. Imaging microvascular obstruction and its clinical significance following acute myocardial infarction. *Heart Fail Rev*. 2006; 11(4):305-312.

Matsushima S, Tsutsui H, Sadoshima J. Physiological and pathological functions of NADPH oxidases during myocardial ischemia-reperfusion. *Trends Cardiovasc Med*. 2014; 24(5): 202-5.

McCafferty K, Forbes S, Thiernemann C, Yagoob MM. The challenge of translating ischemic conditioning from animal models to humans: the role of comorbidities. *Dis Model Mech*. 2014; 7 (12): 1321-33.

McDonagh TA, Morrison CE, Lawrence A, Ford I, Tunstall-Pedoe H, McMurray JJ, et al. Symptomatic and asymptomatic left-ventricular systolic dysfunction in an urban population. *Lancet*. 1997; 350(9081): 829-33.

Mehta P, Cowie E. Epidemiology and pathophysiology of heart failure. *Medicine*. 2006; 34: 210-14.

Ministério da Saúde (BR), Datasus. Sistema de informações de mortalidade. Óbitos por residência por ano do óbito segundo capítulo CID-10. Brasília: Ministério da Saúde, 2011.

Miura T, Tanno M, Sato T. Mitochondrial kinase signalling pathways in myocardial protection from ischaemia/reperfusion-induced necrosis. *Cardiovasc Res*. 2010; 88(1): 7-15.

Muller AP, Ferreira GK, Pires AJ, de Bem SG, de Souza DL, de Abreu BJ, Silveira PCL. Gold nanoparticles prevent cognitive deficits, oxidative stress and inflammation in a rat model of sporadic dementia of Alzheimer's type. *Materials Science and Engineering*. 2017; C, 77, 476-483.

Muradian J, Marques FLN. Síntese da 2-metoxi isobutil isonitrila (MIBI) para uso médico. *Radio/. Bras*. 1992; 25: 171-172.

Naghavi M, Wang H, Lozano R, Davis A, Liang X, Zhou M, et al. Global, regional, and national age-sex specific all-cause and cause-specific mortality for 240 causes of death, 1990-2013: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2013. *Lancet*. 2015; 385(9963): 117-71.

Nah DY, Rhee MY. The Inflammatory Response and Cardiac Repair After Myocardial Infarction. *Korean Circ J*. 2009 Oct; 39(10): 393–398.

Neri M, Riezzo I, Pascale N, Pomara C, Turillazzi M. Ischemia/Reperfusion Injury following Acute Myocardial Infarction: A Critical Issue for Clinicians and Forensic Pathologists. *Mediators Inflamm*. 2017; 2017: 1-14.

Nian M, Lee P, Khaper N, Liu P. Inflammatory cytokines and postmyocardial infarction remodeling. *Circ Res*. 2004; 94(12): 1543-53.

Nohl H, Koltover V, Stolze K, Esterbauer H. Ischemia/Reperfusion Impairs Mitochondrial Energy Conservation and Triggers O₂⁻ Release as a Byproduct of Respiration. *Free Radic Res Commun*. 2009; 18: 127-37.

O'Gara PT, Kushner FG, Ascheim DD, Casey DE Jr, Chung MK, de Lemos JA, et al. 2013 ACCF/AHA guideline for the management of ST-elevation myocardial infarction: a report of the American College of Cardiology Foundation/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines. *Circulation*. 2013; 127(4): 362-425.

Ong SB, Kalkhoran SB, Cabrera-Fuentes HA, Hausenloy DJ. Mitochondrial fusion and fission proteins as novel therapeutic targets for treating cardiovascular disease. *Eur J Pharmacol*. 2015; 763(Pt A): 104-14.

O'Neill WW, et al. Acute Myocardial Infarction with Hyperoxemic Therapy (AMIHOT): a prospective, randomized trial of intracoronary hyperoxemic reperfusion after percutaneous coronary intervention. *J Am Coll Cardiol* 2007;50(5):397–405.

Papadopoulos M, Paschali E, Chiotellis, E. Synthesis, kit formulation analysis and biological studies of ^{99m}Tc-MIBI for myocardial perfusion

imaging". Demokritos National Centre for Scientific Research, Athens, Greece, 1994.

Paula MM, Petronilho F, Vuolo F, Ferreira GK, De Costa L, Santos GP, et al. Gold nanoparticles and/or N-acetylcysteine mediate carrageenan-induced inflammation and oxidative stress in a concentration-dependent manner. *J Biomed Mater Res A*. 2015; 103(10): 3323-30.

Pei H, Yang Y, Zhao H, Li X, Yang D, Li D, Yang Y. The Role of Mitochondrial Functional Proteins in ROS Production in Ischemic Heart Diseases. *Oxid Med Cell Longev*. 2016; 2016: 5470457.

Piegas LS, et al. V Diretriz da Sociedade Brasileira de Cardiologia sobre tratamento do infarto agudo do miocárdio com supradesnível do segmento ST. *Arquivos brasileiros de cardiologia*. 2015; 105.2 : 1-121.

Pinho RA, PinhoCA, Tromm CB, Pozzi BG, Souza DR, Silva LA, Souza CT. Changes in the cardiac oxidative metabolism induced by PGC-1 {alpha}: response of different physical training protocols in infarction-induced rats. *International journal of cardiology*. 2013; 168(4), 4560-4562.

Piper HM, García-Dorado D, Ovize M. A fresh look at reperfusion injury. *Cardiovasc Res*. 1998; 38(2): 291-300.

Piwnica-Worms D, Kronauge JF, LeFurgey A, Backus M, Hockett D, Ingram P, Davison A. Mitochondrial localization and characterization of 99 Tc-SESTAMIBI in heart cells by electron probe X-ray microanalysis and 99 Tc-NMR spectroscopy. *Magnetic resonance imaging*. 1994; 12(4), 641-652.

Rahman I, Kode A, Biswas SK. Assay for quantitative determination of glutathione and glutathione disulfide levels using enzymatic recycling method. *Nat Protoc*. 2006; 1(6): 3159-65.

Regitz V, Paulson DJ, Hodach RJ, Little SE, Schaper W, Shug AL. Mitochondrial damage during myocardial ischemia. *Basic Res Cardiol*. 1984 Mar-Apr;79(2):207-17.

Ruiz-Meana M, Núñez E, Miro-Casas E, Martínez-Acedo P, Barba I, Rodriguez-Sinovas A, et al. Ischemic preconditioning protects cardiomyocyte mitochondria through mechanisms independent of cytosol. *J Mol Cell Cardiol.* 2014; 68: 79-88.

Säterborg, NE. The distribution of ^{198}Au injected intravenously as a colloid and in solution. *Acta radiologica: therapy, physics, biology.* 1973; 12(6), 509-528.

Scheller J, Chalaris A, Schmidt-Arras D, Rose-John S. The pro-and anti-inflammatory properties of the cytokine interleukin-6. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research.* 2011; 1813(5), 878-888.

Sedláková E, Rácz O, Lovássová E, Beňačka R, Kurpas M, Chmelárová A, et al. Markers of oxidative stress in acute myocardial infarction treated by percutaneous coronary intervention. *Cent Eur J Med.* 2009; 4(1): 26–31.

Shuai K, Liu B. Regulation of JAK-STAT signalling in the immune system. *Nature reviews. Immunology.* 2003; 3(11), 900.

Somasuntharam I, Yehl K, Carroll SL, Maxwell JT, MartinezMD, Che PL, Brown ME, Salaita K, Davis ME. Knockdown of $\text{TNF-}\alpha$ by DNzyme gold nanoparticles as an anti-inflammatory therapy for myocardial infarction. *Biomaterials.* 2016; 83: 12-22.

Sunaga D, Tanno M, Kuno A, Ishikawa S, Ogasawara M, Yano T, et al. Accelerated recovery of mitochondrial membrane potential by GSK-3 β inactivation affords cardiomyocytes protection from oxidant-induced necrosis. *PLoS One.* 2014; 9(11): e112529.

Szepesi J, et al. Comparison of the efficiency of $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ exchanger or Na^+/H^+ exchanger inhibition and their combination in reducing coronary reperfusion-induced arrhythmias. *Journal of Physiology and Pharmacology.* 2013; 66.2 (2015): 215-226.

Tanno M, Kuno A, Ishikawa S, Miki T, Kouzu H, Yano T, et al. Translocation of glycogen synthase kinase-3 β (GSK-3 β), a trigger of permeability transition, is kinase activity-dependent and mediated by

interaction with voltage-dependent anion channel 2 (VDAC2). *J Biol Chem.* 2014; 289(42): 29285-96.

Tao L, Gao E, Bryan NS, Qu Y, Liu HR, Hu A, et al. Cardioprotective effects of thioredoxin in myocardial ischemia and reperfusion: role of S-nitrosation [corrected]. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2004; 101(31): 11471-6.

Tartuce LP, Pinho RA. Caracterização química e biológica da associação entre nanopartícula de ouro e sestamibi na lesão de reperfusão cardíaca. Programa de pós-graduação em ciências da saúde, mestrado. Criciúma, SC, Universidade do Extremo Sul Catarinense. 2017.

Tatarkova Z, Kaplan P, Matejovicova M, Lehotský J. Effect of ischemia and reperfusion on protein oxidation in isolated rabbit hearts. *Physiological research.* 2005; 54(2), 185.

Turer AT, Hill JA. Pathogenesis of myocardial ischemia-reperfusion injury and rationale for therapy. *Am J Cardiol.* 2010;106(3): 360-8.

Turkevich J, Stevenson PC, Hillier J. A study of the nucleation and growth processes in the synthesis of colloidal gold. *Discuss. Faraday Soc.* 1951; 11: 55-75.

Ushio-Fukai M. Localizing NADPH oxidase-derived ROS. *Sci STKE.* 2006; 2006(349): re8.

Vander Heide RS, Steenbergen C. Cardioprotection and myocardial reperfusion: pitfalls to clinical application. *Circ Res.* 2013; 113 (4): 464-77.

Wackers FJ, Berman DS, Maddahi J, Watson DD, Beller GA, Strauss HW, et al. Technetium-99m hexakis 2-methoxyisobutyl isonitrile: human biodistribution, dosimetry, safety, and preliminary comparison to thallium-201 for myocardial perfusion imaging. *J Nucl Med.* 1989; 30(3):301-11.

Wong IY, Bhatia SN, Toner M. Nanotechnology: emerging tools for biology and medicine. *Genes Dev.* 2013; 27(22): 2397-408.

Xu Z, Alloush J, Beck E, Weisleder N. A murine model of myocardial ischemia-reperfusion injury through ligation of the left anterior descending artery. *J Vis Exp*. 2014; (86).

Yan Y, Liu J, Wei C, Li K, Xie W, Wang Y, Cheng H. Bidirectional regulation of Ca²⁺ sparks by mitochondria-derived reactive oxygen species in cardiac myocytes, *Cardiovasc. Res*. 2008; 77 432–441.

Yakimovich NO, Ezhevskii AA, Guseinov DV, Smirnova LA, Gracheva TA, Klychkov KS. Antioxidant properties of gold nanoparticles studied by ESR spectroscopy. *Russian Chemical Bulletin*. 2008; 57(3), 520-523.

Yellon DM, Hausenloy DJ. Myocardial reperfusion injury. *N Engl J Med*. 2007; 357(11):1121-35.

Yu L, Li Q, Yu B, Yang Y, Jin Z, Duan W, et al. Berberine Attenuates Myocardial Ischemia/Reperfusion Injury by Reducing Oxidative Stress and Inflammation Response: Role of Silent Information Regulator 1. *Oxid Med Cell Longev*. 2016; 1689602.

Yusuf S, Reddy S, Ounpuu S, Anand S. Global and regional burden of cardiovascular disease and risk factors . *Circulation*. 2001; 104: 2746-53.

Zhang ZW, Xu XC, Liu T, Yuan S. Mitochondrion-Permeable Antioxidants to Treat ROS-Burst-Mediated Acute Diseases. *Oxid Med Cell Longev*. 2016; 2016: 6859523.

Zhao ZQ. Oxidative stress-elicited myocardial apoptosis during reperfusion. *Curr Opin Pharmacol*. 2004 Apr;4(2):159-65.

Zorov DB, Filburn CR, Klotz LO, Zweier JL, Sollott SJ. Reactive oxygen species (ROS)-induced ROS release: a new phenomenon accompanying induction of the mitochondrial permeability transition in cardiac myocytes. *J Exp Med*. 2000; 192(7): 1001-14.

Zortéa D, Silveira PC, Souza PS, Fidelis GS, Paganini CS, Pozzi BG, et al. Effects of phonophoresis and gold nanoparticles in experimental model of muscle overuse: role of oxidative stress. *Ultrasound Med Biol*. 2015; 41(1): 151-62.

Xu Z, Alloush J, Beck E, Weisleder N. A murine model of myocardial ischemia-reperfusion injury through ligation of the left anterior descending artery. *Journal of Visualized Experiments*. 2014; JoVE, (86).